

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de plataformas electroquímicas para biosensado
directo de analitos de relevancia alimentaria y clínica
en muestras de elevada complejidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel

Directores

**José Manuel Pingarrón Carrazón
Ángel Julio Reviejo García
Susana Campuzano Ruiz**

Madrid

Desarrollo de Plataformas Electroquímicas para Biosensado Directo de Analitos de Relevancia Alimentaria y Clínica en Muestras de Elevada Complejidad

Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel

Directores:

José Manuel Pingarrón Carrazón

Ángel Julio Reviejo García

Susana Campuzano Ruiz



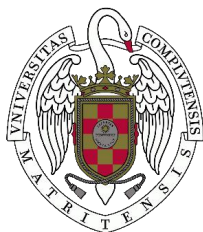
MADRID 2019

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Analítica

Universidad Complutense de Madrid



Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Analítica

Tesis Doctoral:

Desarrollo de Plataformas Electroquímicas para Biosensado Directo de Analitos de Relevancia Alimentaria y Clínica en Muestras de Elevada Complejidad

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel

Bajo la dirección de los doctores:

José Manuel Pingarrón Carrazón

Ángel Julio Reviejo García

Susana Campuzano Ruiz

MADRID 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel,
estudiante en el Programa de Doctorado D9BL - DOCTORADO EN QUÍMICA AVANZADA,
de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Desarrollo de plataformas electroquímicas para biosensado directo de analitos de relevancia
alimentaria y clínica en muestras de elevada complejidad

y dirigida por: José Manuel Pingarrón Carrazón, A. Julio Reviejo García y Susana Campuzano Ruiz

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 23 de septiembre de 2019

Fdo.: 

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



Universidad Complutense de Madrid

Dpto. Química Analítica – Facultad de CC. Químicas - Ciudad Universitaria. 28040 Madrid

Tfno.: 34 913944331

E-mail:depquian@ucm.es

**DOÑA M^a CRUZ MORENO BONDI, CATEDRÁTICA Y DIRECTORA DEL
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

HACE CONSTAR:

Que el trabajo titulado *“Desarrollo de plataformas electroquímicas para biosensado directo de analitos de relevancia alimentaria y clínica en muestras de elevada complejidad”* ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores **José Manuel Pingarrón Carrazón, Ángel Julio Reviejo García y Susana Campuzano Ruiz**, profesores de dicho departamento, constituyendo la Tesis Doctoral de su autor.

Madrid, 23 de Septiembre de 2019

Fdo: M^a Cruz Moreno Bondi

Fdo. José Manuel Pingarrón Carrazón

Fdo. Ángel Julio Reviejo García

Fdo. Susana Campuzano Ruiz

Fdo. Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel

ÍNDICE

1. SUMMARY.....	1
1.1. Introduction.....	3
1.1.1. Food safety and clinical biomarkers.....	3
1.1.1.1. Emerging food safety biomarkers.....	3
1.1.1.2. Relevant clinical biomarkers for direct detection and body-monitoring.....	4
1.1.2. Electrochemical affinity biosensors: promising alternatives to conventional methodologies.....	5
1.2. Aims of this work.....	8
1.3. Research results.....	9
1.3.1. Electrochemical biosensors for food allergens and frauds determination.....	9
1.3.1.1. Immunosensors for β -lactoglobulin and α -lactalbumin.....	10
1.3.1.2. Immunosensors for Ara h 1 and Ara h 2.....	11
1.3.1.3. Immunosensor for ovomucoid.....	12
1.3.1.4. Immunosensing platform for simultaneous Ara h 1 and Ara h 2 determination.....	12
1.3.1.5. Immunosensing platform for individual or simultaneous bovine, ovine and caprine IgG determination.....	13
1.3.1.6. Nucleic acid-based biosensor for DNA sequence encoding the hazelnut allergenic protein Cor a 9.....	14
1.3.1.7. Nucleic acid-based biosensor for horsemeat adulteration.....	15
1.3.2. (Bio)sensors coupled to protective coatings.....	16
1.3.2.1. Delayed sensor activation based on transient coatings.....	16
1.3.2.2. Edible enzymatic biosensor coupled to pH-responsive protective coatings.....	17
1.4. Milestones.....	18
2. INTRODUCCIÓN.....	21
2.1. Objetivos y plan de trabajo.....	23

2.2. Biosensado electroquímico en el campo clínico y alimentario. Antecedentes bibliográficos.....	26
2.2.1. Biosensores electroquímicos para seguridad alimentaria.....	32
2.2.1.1. Inmunosensores.....	34
2.2.1.2. Biosensores de ácidos nucleicos.....	46
2.2.2. Plataformas electroanalíticas para análisis rutinarios y/o descentralizados de biomarcadores de interés clínico.....	55
2.3. Evolución de la electroquímica en el análisis de muestras de elevada complejidad.....	61
2.3.1. Relevancia y problemática a resolver en el análisis directo de biomarcadores en muestras complejas.....	63
2.3.2. Estrategias antiensuciamiento en biosensado electroquímico.....	67
2.3.2.1. Empleo de partículas magnéticas como soportes sólidos para la fabricación de biosensores.....	67
2.3.2.2. Empleo de modificadores electródicos que imparten propiedades antiensuciamiento.....	73
2.4. Interés y métodos para determinar alérgenos y fraudes alimentarios.....	78
2.4.1. Alérgenos y fraudes alimentarios en muestras de leche.....	82
2.4.2. Alérgenos en frutos secos.....	86
2.4.3. Alérgenos en huevo.....	91
2.4.4. Adulteraciones en muestras cárnicas.....	93
2.4.5. Determinación de alérgenos y fraudes alimentarios.....	96
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	109
3.1. Instrumentación.....	111
3.1.1. Instrumentos y aparatos.....	111
3.1.2. Electrodos y dispositivos empleados para las medidas electroquímicas.....	112

3.1.3. Otra instrumentación empleada.....	113
3.2. Reactivos y disoluciones.....	115
3.2.1. Reactivos.....	115
3.2.1.1. Reactivos empleados en el desarrollo de biosensores magnéticos...	115
3.2.1.2. Reactivos empleados en la preparación de biosensores enzimáticos y comestibles con recubrimientos temporales.....	120
3.2.1.3. Reactivos empleados en la preparación de disoluciones.....	120
3.2.2. Preparación de disoluciones.....	122
3.2.2.1. Disoluciones reguladoras.....	122
3.2.2.2. Disoluciones empleadas en la fabricación de los biosensores.....	123
3.2.2.3. Disoluciones empleadas para la extracción de proteínas o ácidos nucleicos.....	125
3.2.2.4. Disoluciones sintéticas simuladas del tracto digestivo o fluidos complejos.....	126
3.3. Procedimientos experimentales.....	127
3.3.1. Protocolos de extracción y aislamiento de proteínas y ácidos nucleicos.....	127
3.3.2. Protocolos de amplificación por PCR.....	130
3.3.3. Preparación de inmunosensores para la determinación de marcadores proteicos.....	131
3.3.3.1. Fabricación de inmunocaptadores.....	131
3.3.3.2. Determinación individual de marcadores proteicos.....	133
3.3.3.3. Determinación multiplexada de marcadores proteicos.....	134
3.3.4. Preparación de biosensores para la determinación de marcadores genéticos.....	136
3.3.5. Biosensores enzimáticos y comestibles.....	140
3.3.5.1. Preparación de electrodos serigrafiados de glucosa.....	141
3.3.5.2. Preparación de electrodos comestibles de glucosa.....	141
3.3.5.3. Modificación de sensores o biosensores enzimáticos con recubrimientos transitorios.....	142

3.3.6. Medidas electroquímicas.....	142
3.3.6.1. Amperometría en disoluciones agitadas.....	142
3.3.6.2. Cronoamperometría.....	144
3.3.6.3. Voltamperometría cíclica.....	145
3.3.7. Análisis de muestras reales.....	145
3.3.7.1. Determinación de marcadores proteicos en muestras de leche.....	145
3.3.7.2. Determinación de marcadores proteicos en extractos alimentarios...	147
3.3.7.3. Determinación de marcadores genéticos en extractos de ADN o lisados mitocondriales.....	149
3.3.7.4. Análisis en fluidos biológicos o gastrointestinales sintéticos.....	150
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	153
4.1. Plataformas inmunosensoras electroquímicas para proteínas alergénicas en alimentos.....	156
4.1.1. Determinación de β-lactoglobulina y α-lactoalbúmina en leche.....	156
4.1.1.1. Desarrollo de inmunosensores para la determinación individual de β -LG y α -LA.....	158
4.1.1.2. Evaluación de la selectividad.....	166
4.1.1.3. Determinación de β -LG en muestras de leche.....	168
4.1.1.4. Determinación de α -LA en muestras de leche.....	171
4.1.2. Detección de cacahuete mediante la determinación de Ara h 1 y Ara h 2.....	174
4.1.2.1. Aseguramiento de la determinación a través de inmunoensayos tipo sándwich.....	176
4.1.2.2. Evaluación de la selectividad.....	184
4.1.2.3. Determinación de Ara h 1 en matrices alimentarias y saliva.....	185
4.1.2.4. Determinación de Ara h 2 en matrices alimentarias.....	190
4.1.3. Inmunosensor para la determinación de ovomucoide.....	195
4.1.3.1. Implementación del inmunosensor para la determinación de ovomucoide.....	196
4.1.3.2. Evaluación de la selectividad.....	202
4.1.3.3. Aplicación al análisis de matrices alimentarias.....	204

4.1.3.4. Simplificación de la metodología desarrollada.....	208
4.2. Plataformas inmunosensoras electroquímicas para la multideterminación de marcadores proteicos de alérgenos y fraudes alimentarios.....	210
4.2.1. Plataforma inmunosensora dual para la determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2.....	210
4.2.1.1. Determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2.....	212
4.2.1.2. Evaluación de interferencias.....	217
4.2.1.3. Determinación de Ara h 1 y Ara h 2 en matrices alimentarias.....	218
4.2.1.4. Detección total de las principales proteínas alergénicas del cacahuete en matrices alimentarias.....	223
4.2.2. Plataforma inmunosensora para la detección de adulteraciones en leche a través de la determinación individual o simultánea de las IgGs bovinas, ovinas y caprinas.....	228
4.2.2.1. Fiabilidad de los inmunoensayos y optimización de variables experimentales.....	230
4.2.2.2. Características analíticas y operacionales.....	235
4.2.2.3. Evaluación de la selectividad.....	239
4.2.2.4. Análisis de muestras de leche y detección de adulteraciones.....	241
4.2.2.5. Detección de adulteraciones con calostro a través de la determinación del contenido total de IgGs en leche.....	245
4.2.2.6. Plataforma multiplexada de cribado para identificación del origen, detección de adulteraciones entre especies e identificación de la presencia de calostro en leche.....	248
4.3. Desarrollo de plataformas genosensoras electroquímicas para la determinación de marcadores genéticos de alérgenos y fraudes alimentarios.....	252
4.3.1. Genosensor para la detección de la secuencia de ADN que codifica la proteína alergénica Cor a 9 de la avellana.....	252
4.3.1.1. Características operacionales y analíticas.....	254
4.3.1.2. Determinación de amplicones obtenidos por PCR.....	260
4.3.1.3. Evaluación de la reproducibilidad y selectividad del acoplamiento PCR de tiempo reducido-genosensor.....	265
4.3.1.4. Evaluación de la sensibilidad para la determinación de los productos de amplificación.....	267

4.3.2. Desarrollo y comparación de plataformas biosensoras con prestaciones analíticas mejoradas para la determinación de ácidos nucleicos.....	269
4.3.2.1. Optimización de variables experimentales.....	272
4.3.2.2. Características analíticas y operacionales.....	277
4.3.2.3. Influencia del formato de bioensayo.....	279
4.3.2.4. Influencia del tamaño del híbrido formado.....	281
4.3.2.5. Evaluación del marcaje enzimático.....	283
4.3.2.6. Estrategias de amplificación.....	286
4.3.2.7. Análisis comparativo de las prestaciones analíticas alcanzadas para cada plataforma genosensora desarrollada.....	292
4.3.3. Biosensor para la detección de adulteraciones con carne de caballo. 294	294
4.3.3.1. Aplicación al análisis de extractos de ADN.....	298
4.3.3.2. Aplicación al análisis de lisados mitocondriales crudos.....	301
4.3.3.3. Evaluación de la selectividad.....	302
4.3.3.4. Aplicación al análisis de adulteraciones alimentarias con carne de caballo.....	303
4.4. Desarrollo de biosensores enzimáticos basados en recubrimientos protectores poliméricos de disolución controlada.....	306
4.4.1. Sensores de activación retardada basados en el empleo de recubrimientos protectores poliméricos de disolución controlada en el tiempo para el (bio)sensado continuo en medios biológicos de elevada complejidad.....	306
4.4.1.1. Optimización y evaluación de la disolución y activación controlada en el tiempo.....	308
4.4.1.2. Características operacionales del recubrimiento protector.....	312
4.4.1.3. Evaluación del funcionamiento de los recubrimientos protectores en medios biológicos y/o complejos.....	313
4.4.1.4. Desarrollo de plataformas biosensoras para su aplicación en entornos biológicos complejos.....	315
4.4.2. Biosensor enzimático comestible acoplado a recubrimientos protectores poliméricos de activación controlada.....	319
4.4.2.1. Desarrollo de biosensores enzimáticos comestibles para biosensado en fluido gastrointestinal.....	320

4.4.2.2. Modificación de biosensores comestibles con recubrimientos poliméricos protectores para su disolución y activación controlada dependiente del tiempo y pH del medio de incubación.....	324
5. CONCLUSIONS.....	327
6. BIBLIOGRAFÍA.....	331
7. RESUMEN EN ESPAÑOL.....	359
8. RESUMEN EN INGLÉS.....	365
9. DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA DE RESULTADOS.....	371
10. GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	389
11. PUBLICACIONES / PUBLISHED PAPERS.....	399

1.1. Introduction

1.2. Aims of this work

1.3. Research results

1.4. Milestones

1. SUMMARY

1.1. Introduction

1.1.1. Food safety and clinical biomarkers

The term “biomarker” or “biological marker” has been defined as “cellular, biochemical or molecular alterations that are measurable in biological media such as human tissues, cells, fluids, etc.” [Mayeux, 2004]. More recently, in 1998, the National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group defined it as “a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention” [Strimbu, 2010]. Although the term biomarker is directly related to health markers, the biomolecules used to ensure food quality and safety, such as the absence of toxic compounds, pathogens or allergens, which are directly related to the health of the population, may also be called biomarkers.

Various types of molecules, such as genes, proteins or hormones, can serve as biomarkers. They are present in cells, tissues or biological fluids (such as blood, saliva, sweat...) of humans, animals, plants or other (micro)organisms and their levels depend on both, the type of biomarker and the tissue or fluid analyzed [Altintas, 2013].

1.1.1.1. Emerging food safety biomarkers

The global population is expected to increase requiring up to 70 % more food in 2050, and demanding food production systems and the food chain to become fully sustainable [King, 2017]. During the past few decades, food quality and safety have become a topic of public awareness. Guaranteeing food safety is nowadays the main focus of authorities. Contaminants may enter the food chain during various stages of production, accumulate in food during storage, form in the food or may be concentrated from the natural food components. Allergens, drug residues, or pathogen microorganisms are some of the main targets concerning food safety. The evolution of society and its nutritional and economic requirements are making necessary to evaluate emerging targets such as food allergen, the introduction of genetically modified organisms into the food

market, as well as adulteration species, due to the various food-related crisis occurred which have undermined public confidence [Martín-Fernández, 2017], [Campuzano, 2017-a].

Food allergy affects around 80 % of the child population and 5 % of the adult population, being known as "the pandemic of the 21st century" [Sathe, 2016]. Although proteins represent a minimal proportion of total food mass, most food allergens are proteins, as they have the capacity to generate an exacerbated immune response, and may cause serious or mortal reactions even at trace levels [Campuzano, 2016]. This is the reason why protein markers have essentially been used for the identification of food allergens. Furthermore, their study allows knowing their allergenic potential, depending on different thermal processes, or their degradation in our organism during digestion. As protein markers are able to modify their structure or denatured during food processing, proteins strongly resistant to temperature, pressure or enzyme digestion, or genetic markers (genes that encode the target allergenic proteins) more resistant than proteins to degradation by these phenomena, are usually selected as food allergy target biomarkers [Asensio, 2008].

Another challenge for the food industry is to ensure the correct labeling of food products, including the identification of any kind of adulterations, particularly the differentiation between species of animals or plants, due to their high homology and similarity of organoleptic characteristics. In this context, genetic targets are commonly selected as biomarkers for the species identification, due to their high specificity, in comparison with the cross reactivity observed among proteins of different species. It is worth noting the emerging use of antibodies as biomarkers for species identification, due to the high specificity shown between different species as well as their higher resistance to proteolysis compared to proteins.

1.1.1.2. Relevant clinical biomarkers for direct detection and body-monitoring

The continuous and direct monitoring of biomarkers is revolutionizing clinical diagnostics nowadays, improving and opening a new dimension in personalized medicine [Campuzano, 2019-a]. Wearable (bio)sensors are garnering substantial interest due to

their potential to provide continuous, real-time physiological information via dynamic, non-invasive measurements of biochemical markers (metabolites, bacteria and hormones) in biofluids, such as sweat, tears, saliva and interstitial fluid (ISF). All this would allow finding the correlations between analyte concentrations in the blood and non-invasive biofluids for the real use of circulating biomarkers in biological fluids for the continuous monitoring of diseases or disorders [Kim, 2019].

Currently, a considerable number of devices have been developed for monitoring of different biomarkers, at different molecular level, for non-invasive chemical analysis in sweat, tears, saliva or ISF, and have already been widely applied to a variety of head-to-toe application sites. The most relevant clinical biomarkers for direct detection and body-monitoring are metabolites (lactate, glucose, urea, ethanol or cortisol) along with electrolytes (sodium, potassium, chloride or ammonium), trace elements (zinc or copper) and small amounts of large molecules (proteins, nucleic acids, neuropeptides or cytokines) in sweat; electrolytes (sodium, phosphate, magnesium, potassium or calcium), metabolites (glucose, alcohol, lactate or cortisol) and proteins, in the ISF; both low- and high-molecular weight compounds, such as proteins, peptides, lipids, metabolites and electrolytes, in human tears; and metabolites, enzymes, hormones, proteins, microorganisms and ions, in saliva [Kim, 2019].

Although the most important challenges facing this technology are ensuring accurate and reliable wearable sensor responses, surface fouling issues pose also a major challenge to the continuous operation of on-body biosensors.

1.1.2. Electrochemical affinity biosensors: promising alternatives to conventional methodologies

An electrochemical biosensor is a device capable of providing quantitative or semi-quantitative analytical information using a recognition element of biological origin, immobilized on a transducer/solid surface, in connection to an electrochemical transducer, which converts the physical, chemical and/or biological changes occurring into a quantifiable electrochemical signal [Arduini, 2016]. Electrochemical affinity biosensors are based on the selective, robust and stable interactions between the target analytes and the biomolecules, used as receptors, governed by affinity interactions, under

thermodynamic considerations, such as antigen-antibody or protein-nucleic acid bonds and oligonucleotide hybridization. The main affinity bio-receptors used in these biosensing approaches include antibodies, aptamers and DNA or RNA oligonucleotides (both single and double-stranded, linear and hairpin probes) [Ronkainen, 2010], [Campuzano, 2017-a].

Several methods have been reported for protein and genetic markers detection. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and DNA-based methods involving the use of polymerase chain reaction (PCR) techniques, are the most commonly used methods for the analysis of clinical and food samples. However, they present some limitations, which include false positive, due to cross-reactivity or problems during DNA amplification, lower sensitivity to heat treatments, they require multiple steps, expensive instrumentation and professional handling, high analysis time, have limited multiplexing capabilities and only for some nature biomarkers and applicability mainly in centralized environments. For this purpose, and as an alternative to conventional methodologies, electrochemical affinity biosensing platforms are very interesting tools which allow the determination of the target analyte quickly and easily with high sensitivity and selectivity in complex food matrices after minimal pre-treatments and using low cost instrumentation, low sample volumes, negligible energy consumption, compatibility with miniaturization and use in decentralized environments [Campuzano, 2018], [Wang, 2006-b], as well as the possibility of their use in complex fluids, colored or turbid, such as saliva, whole blood or food matrices, in the presence of chromophores, fluorophores or particles in suspension [Ronkainen, 2010].

Another important advantage offered by electrochemical biosensors in the analysis of clinical or food samples is the possibility to perform multiplexed determination of biomarkers at the same or different molecular level or with very different clinical ranges. Due to the complexity of biological systems, a single biomarker determination is not effective enough for an accurate diagnosis. Medical decision based on single biomarker analysis usually has a high possibility of false positives and negatives. In addition, the selection of biomarkers of different nature also allows an overall estimation of patient's health and reduces the probability that markers of different molecular levels could suffer the same degradation in similar environments [Wei, 2009]. For food safety biomarkers analysis, particularly in the determination of food allergens, it is important to note that the majority of the allergic population is sensitized to several proteins in the same food,

so that only multiplexed determination would allow evaluating both the total allergenic potential and the influence of food processing. In this sense, it is expected that the simultaneous determination of protein and genetic markers will improve the specificity and ensure the authenticity of the obtained results for the analysis of allergens or food frauds, due to the different stability of biomarkers at the genetic and functional level against different food processes which ensures the unequivocal detection after aggressive temperature or pressure environments [Hengel, 2007]. Therefore, multiplexing detection of different molecular level biomarkers is essential for accurate clinical diagnosis and food safety.

1.2. Aims of this work

Taking into account all of the foregoing, the aim of this work includes the design, development and application of novel electrochemical biosensing platforms, based on simple and rapid protocols, for the individual or multiplexed, sensitive and selective determination of various protein and genetic markers, characteristic of the presence of allergens and food frauds of great current relevance in our society.

As it will be discussed below, this Thesis has focused on the most relevant food allergies affecting the infant population, such as milk and eggs, and the allergens responsible for the most severe allergic reactions, such as peanuts and hazelnuts, as well as the species-identification for the detection of adulteration (according to European Legislation) with horsemeat and milk or colostrum of the same or different animal origin. For this purpose, allergenic proteins, antibodies and specific DNA fragments have been selected as targets. All this research has been carried out in collaboration with: Plants Biotechnology Group of the Biological Sciences Faculty and Structure-Function in Proteins Group of the Chemical Sciences Faculty, both from the Complutense University of Madrid, Germplasm Bank of the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries and Zeulab S.L. Company.

As it will be shown, different electrochemical biosensors were implemented involving the individual or multiplexed determination of protein or genetic markers of interest in food safety. All the developed biosensors were exhaustively optimized and characterized and applied to the analysis of the target biomarkers in complex food and biological samples. It is worth highlighting also the development of (bio)sensors based on bio-compatible pH-sensitive transient polymer coatings, for biosensing under prolonged incubation in complex biological fluids, research carried out during the international predoctoral stay I enjoyed at the University of California San Diego, supervised by Prof. Joseph Wang.

1.3. Research results

The research work performed within the frame of this PhD Thesis, and whose most relevant aspects are briefly discussed in the following sections, includes the successful development of several amperometric immunosensors for the determination of the main allergenic proteins present in milk, egg and peanuts and of animal species adulterations in milk and nucleic acid-based biosensors for the identification of the hazelnut and horsemeat adulterations. Furthermore, the development of novel strategies for imparting antifouling properties for (bio)sensing surfaces based on the modification of the electrode surfaces with transient pH-sensitive polymer coatings, has also been conducted.

This section will discuss the most relevant features regarding the performance and applicability to the analysis of real samples of the developed electrochemical biosensing platforms.

1.3.1. Electrochemical biosensors for food allergens and frauds determination

All the biosensing platforms developed for the determination of protein or genetic markers of allergens and food frauds are based on the use of magnetic beads (MBs) as solid supports to perform all the affinity reactions. The resulting modified MBs are magnetically captured on the surface of screen printed carbon electrodes (SPCEs) by using a magnet placed right under the surface of its working electrode and the amperometric responses are measured at -0.20 V (*vs.* Ag pseudo-reference electrode), upon addition of hydroquinone (HQ), used as electron transfer mediator, and H₂O₂ as the enzyme substrate.

1.3.1.1. Immunosensors for β -lactoglobulin and α -lactalbumin

Disposable MBs-based immunosensors have been developed for the determination of the most important allergenic proteins in milk (β -lactoglobulin (β -LG) and α -lactalbumin (α -LA)). These approaches are based on a sandwich configuration assay involving covalent immobilization of the capture antibody onto activated carboxylic-modified MBs (HOOC-MBs) and incubating the resulting magnetic immunocaptors (anti- β -LG-MBs or anti α -LA-MBs) sequentially (determination of β -LG) or in a single step (determination of α -LA) with the target protein and with horseradish peroxidase (HRP) labeled detector antibody (anti- β -LG-HRP or anti- α -LA-HRP).

These immunosensors have shown excellent analytical and operational characteristics, with detection limits (LOD) of 0.8 ng mL^{-1} (20 pg in 25 μL sample) and 0.011 ng mL^{-1} (0.28 pg in 25 μL sample) for β -LG and α -LA, respectively. Relative standard deviation (RSD) values obtained between the amperometric signals provided by ten different immunosensors fabricated in the same manner for the same standard concentration were of 8.4 and 8.1 % for β -LG and α -LA, respectively. Moreover, both immunocaptors (anti- β -LG-MBs or anti α -LA-MBs) demonstrate a storage stability of 12 days at 4 °C in filtered PBS.

The methodology developed for β -LG offered an excellent analytical performance in terms of sensitivity, selectivity and reliability for the determination of β -LG in different types of milk without any matrix effect, with no need of complex or time-consuming pretreatment steps, after a simple sample dilution and just in 60 min. Its applicability was demonstrated by the analysis of different milk samples and the results were compared by fitting them in a linear least-squares regression graph versus those provided by a commercial ELISA spectrophotometric kit, which involved the same immunoreagents, demonstrating an acceptable correlation ($r = 0.999$) with a slope value of (1.03 ± 0.03) and an intercept of (-58 ± 72) , which included the unit and the zero values, respectively.

The α -LA MBs-based immunosensing platform was applied successfully for the determination of α -LA in several varieties of milk (raw and UHT cows' milk as well as human milk) and infant formulations, in a single step of 30 min. Likewise, the comparison of the results provided by the developed immunosensing platform and the commercial

ELISA using the same immunoreagents, confirmed a good correlation ($r = 0.998$) and slope (1.00 ± 0.03) and intercept values (0.01 ± 0.02) which included the unit and the zero values, respectively.

1.3.1.2. Immunosensors for Ara h 1 and Ara h 2

For the individual determination of the main allergenic peanut proteins (Ara h 1 and Ara h 2), two amperometric MBs-based immunosensing platforms have been developed involving selective capture and detector antibodies and carboxylic-modified magnetic beads (HOOC-MBs) in a sandwich configuration. In these particular approaches, detector antibodies are labeled with HRP-conjugated streptavidin (Strep-HRP) (Ara h 1 determination) or HRP-conjugated secondary antibodies (Ara h 2 determination).

The developed immunosensing platforms exhibit LOD of 6.3 ng mL^{-1} and 26 pg mL^{-1} for Ara h 1 and Ara h 2, respectively, as well as a great selectivity against other non-target proteins. Both immunosensors have been successfully applied for the determination of Ara h 1 and Ara h 2 in different food extracts without any matrix effect after an appropriate sample dilution. The results obtained with both immunosensors were successfully compared with those provided by the ELISA kits using the same immunoreagents. Excellent correlations were found for both target proteins with confidence intervals (at a significance level of $\alpha = 0.05$) for the slope and intercept values which include the unit and the zero values, respectively.

The immunosensing platforms developed were also applied to the analysis of minimum amounts of peanuts, and were able to detect 500 mg Kg^{-1} of peanut in cookies spiked samples (using Ara h 1 immunosensor) or trace amounts of the peanut allergen (5.0 mg kg^{-1}) in wheat flour spiked samples (using Ara h 2 immunosensor), also highlighting the possibility of monitoring the content of Ara h 1 directly in raw human undiluted saliva samples, after ingestion of a peanut butter sandwich.

1.3.1.3. Immunosensor for ovomucoid

The egg allergenic protein, ovomucoid (OM), was also selected for development of the first amperometric immunosensor reported so far for egg determination through the highly sensitive determination of OM. The approach involves the selective capture of the immunocomplexes formed by sandwiching the target allergenic protein between a capture antibody and the same antibody but conjugated with HRP as detector antibody onto HOOC-MBs, in a 30-min single step.

The as prepared electrochemical immunoplateform showed a LOD of 0.1 ng mL^{-1} for the standards determination, which is much lower than those claimed for the commercial ELISA kits available. RSD value obtained for eight different immunosensors fabricated in the same manner was 6.0 %. It is worth remarking the great storage stability (at 4°C in PBS) of 63 days and the good selectivity against other white egg allergenic proteins demonstrated by the developed immunoscaffold.

The fabricated immunosensor was successfully employed for the simple and accurate determination of trace amounts of egg in unprocessed (LOD = 0.17 mg Kg^{-1} in wheat flour spiked samples) and baked (LOD = 0.13 mg Kg^{-1} in bread prepared with traces of egg) food samples, offering notably enhanced sensitivity compared with the claimed detection of 500 mg Kg^{-1} added egg in bread by the commercial ELISA kits.

1.3.1.4. Immunosensing platform for simultaneous Ara h 1 and Ara h 2 determination

Due to the importance and allergenic potential of peanuts in the development of highly severe allergic responses, an immunosensing platform was also developed for the simultaneous determination of its main allergenic proteins, Ara h 1 and Ara h 2. It involves the use of sandwich-type immunoassays onto HOOC-MBs. The resulting modified MBs (for Ara h 1 and Ara h 2) were magnetically trapped onto the working electrodes (W1: Ara h 1 immunosensor and W2: Ara h 2 immunosensor) of dual screen-printed carbon electrodes (SPdCEs) by magnets placed under their surfaces and the

amperometric responses were measured at -0.20 V (vs. Ag pseudo-reference electrode) using the H₂O₂/HQ system.

This methodology exhibited high sensitivity and selectivity for the amperometric determination of both target proteins providing LOD values of 18.0 and 0.07 ng mL⁻¹ for Ara h 1 and Ara h 2, respectively, lower than those claimed for the conventional individual ELISA methodologies using the same immunoreagents, in just 2 h. Their applicability was evaluated by determining the endogenous content of both allergenic proteins in different food extracts as well as trace amounts of peanut (1–10000 mg kg⁻¹) in wheat flour spiked samples.

A novel variant of the methodology was also developed based on the mixture of both immunocaptors (anti-Ara h 1-MBs and anti-Ara h 2-MBs) for the ultra-sensitive detection of peanuts through the total determination of Ara h 1 and Ara h 2. This methodology allows a clear discrimination of samples supplemented with only 1.0 mg Kg⁻¹ of peanut and shows a linear dependence ($r = 0.995$) between the amperometric responses obtained and the logarithm of peanut quantity over five orders of magnitude concentrations (1–10000 mg Kg⁻¹). Therefore, although not designed to identify the type of peanut allergenic protein detected, this smart strategy proves to be a user-friendly one for detecting the presence of peanut in a wide concentration range or verifying the absence of trace amounts of peanuts in foods, without the need for sample-dilution, and in a single amperometric detection.

1.3.1.5. Immunosensing platform for individual or simultaneous bovine, ovine and caprine IgG determination

For the identification of dairy products adulteration with milk or colostrum of the same or different animal origin, various immunosensing platforms have been developed for the individual or simultaneous determination of bovine, ovine and caprine immunoglobulins G (IgGs). They relied on sandwiching each animal species-specific IgGs with selective antibody pairs (same antibody unconjugated and conjugated with HRP for each animal IgG) onto HOOC-MBs used as solid supports, and SPCE transducers for individual determination or disposable screen-printed electrodes with four working electrodes (SPC4E) for multiplexed determinations. The amperometric

responses are measured at -0.20 V (vs. Ag pseudo-reference electrode) using the H₂O₂/HQ system.

These immunoplatforms allowed achieving LODs of 0.74, 0.82 and 0.66 ng mL⁻¹ for the amperometric determination of bovine, ovine and caprine IgGs standards, respectively, in just 30 min, with RSD values, between the amperometric signals provided by eight different immunosensors prepared in the same way, of 4.5, 4.6 and 3.2 %, respectively, and storage stability (at 4 °C in PBS) of the corresponding immunocaptors of 67 days.

These immunoplatforms were successfully applied to the determination of the individual content of the target IgGs in milk samples of different animals (cow, sheep and goat) and type (colostrum, raw and pasteurized), without matrix effect and after just a sample dilution. The developed platforms also demonstrated clear discrimination of raw milks adulterated with 0.1 % (v/v) of milks from other animals, 10-times lower than the amount required by the European Legislation for cow's milk adulteration (1.0 % (v/v)).

In addition to the developed immunosensors for the individual determination of bovine, ovine and caprine IgGs, other variant was smartly designed based on the mixture of the three batches of MBs just to perform the amperometric detection to determine the total IgG content and potential to identify colostrum adulteration. These four different approaches (individual determination of bovine, ovine and caprine IgGs and total IgGs determination) were implemented in multiplexing platforms, as a method of screening dairy product, to identify, in just 30 min, the animal origin, the undergone heat treatment and whether or not the analyzed milk sample was adulterated with milk or colostrum from other species.

1.3.1.6. Nucleic acid-based biosensor for DNA sequence encoding the hazelnut allergenic protein Cor a 9

A disposable amperometric genosensor, based on the use of streptavidin-modified MBs (Strep-MBs) has been developed in connection with the so called “time-reduced PCR” to detect the presence of hazelnut traces by targeting a specific fragment of the *Cor a 9* allergen coding sequence. The approach is based on a sandwich-type

hybridization format, employing Strep-MBs and specific biotinylated capture and detector probes which hybridize contiguously with a 50-mer specific region of the gene encoding the protein Cor a 9. The formed hybrid is captured on the surface of the Strep-MBs and its biotin-free end enzymatically labeled with Strep-HRP.

The developed genosensing platform allows achieving a LOD of 0.72 pM (0.072 fmol) for the synthetic target DNA in a 15 min-single step, a RSD value of 6.2 % (between the amperometric signals provided by eight different sensors prepared in the same manner) and a stability of 30 days of the stored genocaptors (4 °C in filtered B&W buffer).

The developed methodology was also successfully coupled to a reduced-time PCR amplification strategy for the analysis of 100 bp amplification products, showing excellent selectivity against extracts of other fruits and the unequivocal detection of only 20 pg of genomic DNA extracted from hazelnut regardless of variety.

1.3.1.7. Nucleic acid-based biosensor for horsemeat adulteration

In order to develop a methodology sensitive enough to detect a fragment of the *D-Loop* region of the equine mitochondrial DNA, a systematic comparison regarding the influence of some crucial experimental variables involved in the fabrication of the electrochemical nucleic acid-sensor on the final sensitivity of the methodology which included: i) the bioassay format, ii) the use of selective commercial antibodies to DNA/RNA heterohybrids as capture or detector receptors, iii) the length of the formed homo- or hetero-hybrids and iv) the strategies used for enzymatic labeling and/or amplification of the electrochemical responses using commercial affinity receptors conjugated to different number of enzyme units, was carried out.

For this purpose, the performance offered by 11 different biosensing strategies targeting the same DNA and in connection with the use of specific nucleic acid probes and MBs were compared, proving the developed biosensors exhibited improved analytical performance, in terms of sensitivity, and the relevant role played by the experimental variables involved in the assay design and the labeling strategy to tailor the

resulting sensitivity in more than 3 orders of magnitude compared to commonly used sandwich-type hybridization formats.

The electrochemical nucleic acid-sensor that offered the highest sensitivity (LOD: 0.12 pM or 3.0 attomoles, in the detection of a 40-mer synthetic DNA sequence), was based on the immobilization of a 40-mer RNA biotinylated probe specific for a characteristic fragment of horse *D-Loop* mitochondrial DNA onto the surface of Strep-MBs, the use of a commercial antibody specific to RNA/DNA duplexes and its labeling with a bacterial antibody binding protein conjugated with an homopolymer bearing 40 molecules of HRP (ProtA-poly-HRP40). It is worth noting that this approach demonstrated a large amplification factor (771 improved sensitivity) in comparison with the conventional sandwich hybridization strategy and Strep-HRP labeling.

The viability of the biosensing platform developed was evaluated by analyzing the target DNA both in extracted intact mitochondrial DNA (~16660 bp in length) and directly in the raw lysate resulting from alkaline lysis of the mitochondrial mass isolated from meat. The obtained results demonstrated a great sensitivity to other meat samples and the possibility of clearly discriminating the presence of just 0.5 % (w/w) of horsemeat in beef samples, directly from raw mitochondrial cell lysates without previous DNA extraction or PCR amplification, in an assay time as short as 75 min, thus complying with the current legislation for horsemeat adulteration.

1.3.2. (Bio)sensors coupled to protective coatings

1.3.2.1. Delayed sensor activation based on transient coatings

In this research work, the possibility of protecting (bio)sensing surfaces after their prolonged exposure in fouling or denaturing media, was evaluated. For this purpose, polymeric coatings with a programmable transient behavior were used for delayed exposure of fresh surfaces of multi-electrode sensor arrays at preselected times, by tailoring the characteristics of the coating (density and thickness).

This strategy demonstrated the possibility of delaying the coating dissolution/activation of the sensor up to 6 h, with excellent operational characteristics, in terms of reproducibility and controlled coating dissolution/tunable sequential actuation (0, 2, 4 or 6 h) of the individual sensing electrodes. Such delayed sensor actuation has demonstrated its applicability for the protection of electrochemical sensors from severe biofouling after prolonged incubation in protein-rich complex biofluids.

In order to demonstrate the practical applicability of this novel strategy, the transient polymer coatings were used for the modification of enzymatic biosensors for glucose determination, showing their potential, without compromising the biosensor's sensitivity, to perform sequential enzymatic actuation every 2 h (0, 2, 4 or 6 h) and direct glucose monitoring in untreated blood and saliva samples over prolonged periods (2 h).

1.3.2.2. Edible enzymatic biosensor coupled to pH-responsive protective coatings

The unique advantages imparted by these pH-responsive protective coatings were also exploited to ensure enzyme activity in media of denaturing pH values to develop an edible electrochemical biosensor with remarkable prolonged resistance to extreme acidic conditions for direct glucose sensing in gastrointestinal fluids.

This edible biosensor was based on carbon-paste prepared from edible materials, such as olive oil and activated charcoal and glucose oxidase (GOx). The results obtained with the edible biosensor confirmed the GOx enzyme activity protection in strongly acidic conditions and the possibility to perform continuous and direct glucose monitoring over a 90 min period in strong acidic environments (pH 1.5), while the response of conventional SPE biosensors decreased significantly after 10 min incubation in the same biofluid.

The developed edible biosensor was also coupled with different transient pH-sensitive polymer coatings, allowing the dissolution/tuning activation of the sensor in gastric or intestinal fluids at specific predetermined times.

1.4. Milestones

The main milestones of the research work carried along this PhD Thesis include:

- The design and development of amperometric immunosensors based on the use of sandwich-type immunoassay formats and HOOC-MBs for the individual determination of the main allergenic proteins present in milk, egg or peanut and cow, sheep and goats specific-IgGs, as adulteration biomarkers, in dairy products, food extracts and/or saliva samples.
- The development of multiplexed immunosensing platforms for the simultaneous determination of the main allergenic peanut proteins (Ara h 1 and Ara h 2) in food extracts and for the multiplexed detection in dairy products, as a screening method for the identification of animal origin, detection of adulterations inter-species and identification of the presence of colostrum in milk.
- The design, development and comparison of different amperometric biosensing strategies for the determination of nucleic acids, with improved and tailored sensitivity, compatible with their use in point-of-care devices and decentralized settings, just by smart selection of bioassay formats and enzymatic labeling with multienzyme bioreagents.
- The design and development of genosensors coupled with “reduced-time PCR” amplification strategies for the identification of hazelnut presence and nucleic acid biosensors with improved sensitivity attributed to the use of DNA/RNA heterohibrids specific antibodies and bio-conjugates with multiple HRP molecules for the identification of horsemeat adulterations, directly in mitochondrial lysates.
- The design and application of polymeric pH-sensitive coatings for the controlled dissolution at preselected times by tailoring the characteristics of the coating (density and thickness) to ensure the protection and sequential activation of enzymatic biosensing surfaces in complex fluids prone to denature or foul (bio)sensors surfaces.

As it will be described in detail in the Dissemination and Transfer of Results section at the end of this PhD Thesis, the research carried out during this Thesis has allowed the publication of 12 reviewed papers in medium-high impact international journals, 2 articles in national outreach journals, the granting of a European Patent and the application for another one and the presentation of 16 communications to 8 International Congress (5 oral and 4 poster) and 6 National Congress (5 oral and 2 poster).

2.1. Objetivos y plan de trabajo

**2.2. Biosensado electroquímico en
el campo clínico y alimentario.
Antecedentes bibliográficos**

**2.3. Evolución de la
electroquímica en el análisis de
muestras de elevada complejidad**

**2.4. Interés y métodos para
determinar alérgenos y fraudes
alimentarios**

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Objetivos y plan de trabajo

Durante los últimos años, los biosensores están despertando gran interés en la comunidad científica e industrial, ya que combinan de forma inteligente el potencial de la biología, física, química e ingeniería, para proporcionar soluciones innovadoras a los problemas analíticos actuales. En este sentido, los biosensores electroquímicos aprovechan la elevada sensibilidad de los transductores electroquímicos con la exquisita especificidad de los procesos de reconocimiento biológicos, presentándose como alternativas prometedoras para el desarrollo de dispositivos portátiles, de fácil manejo y coste accesible para la determinación de (bio)marcadores en el punto de atención.

De acuerdo con el contrato predoctoral de personal investigador en formación para la realización de la Tesis Doctoral concedido por la Universidad Complutense de Madrid, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el **desarrollo de plataformas electroquímicas para biosensado directo de analitos de relevancia alimentaria y clínica en muestras de elevada complejidad**. Para ello, se han seguido dos estrategias fundamentales: basadas en el empleo de partículas magnéticas como soportes sólidos para la fabricación de biosensores de afinidad, para la determinación de biomarcadores de seguridad alimentaria; o en formatos integrados modificados con recubrimientos poliméricos temporales, para la protección de superficies (bio)sensoras durante su incubación en medios biológicos de elevada complejidad y/o valores de pH desnaturalizantes.

Uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral ha consistido en la **implementación de novedosas bioplataformas electroanalíticas para la determinación individual y/o multiplexada de marcadores proteicos y genéticos de relevancia para la determinación de alérgenos y fraudes alimentarios, de manera rápida, simple, sensible y selectiva**. El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral se ha realizado en los laboratorios del Grupo de Electroanálisis y (Bio)sensores Electroquímicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid y en colaboración con los Grupos de Biotecnología de Plantas y de Estructura-Función en Proteínas de las Facultades de Biología y Química de la Universidad Complutense de Madrid, respectivamente, el Banco de Germoplasma del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries y la empresa Zeulab S.L. La ayuda de estos

Grupos y entidades colaboradoras ha resultado determinante, tanto para la selección y suministro de los (bio)marcadores diana y bioreceptores a emplear, como del tratamiento y/o extracción de matrices alimentarias a analizar.

A continuación, se describe de forma esquemática y secuencial el plan de trabajo seguido para conseguir los objetivos planteados:

1. Evaluación de las técnicas electroanalíticas, de los bioreceptores y de los formatos de bioensayo más adecuados para la determinación rápida, sensible y selectiva de los marcadores diana a nivel genético y funcional seleccionados.
2. Desarrollo de inmunosensores amperométricos para la determinación de proteínas alergénicas e inmunoglobulinas para la identificación de especies animales.
3. Puesta a punto de metodologías eficientes para la extracción de los biomarcadores de interés en matrices alimentarias de diferente naturaleza y complejidad variable.
4. Validación de las plataformas inmunosensoras desarrolladas con las metodologías convencionales para la determinación individual o dual de biomarcadores proteicos.
5. Desarrollo de genosensores amperométricos con prestaciones analíticas mejoradas, en términos de sensibilidad, mediante su acoplamiento a estrategias de amplificación de ácidos nucleicos o basadas en el empleo de bioreceptores comerciales con múltiples unidades de enzima para la identificación de alérgenos y fraudes alimentarios.
6. Puesta a punto de metodologías eficientes para el aislamiento, extracción y/o amplificación de marcadores genéticos y su acoplamiento con los biosensores de ácidos nucleicos desarrollados.
7. Construcción de plataformas biosensoras para la multideterminación de diversos biomarcadores en un único ensayo, como herramientas de fácil manejo para el cribado de alérgenos o fraudes alimentarios.

Otro de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral consistió en el **desarrollo de (bio)sensores electroquímicos de respuesta retardada, basados en el uso de materiales biocompatibles, poliméricos y sensibles al pH, para la monitorización “*in situ*” de analitos de relevancia clínica, directamente en fluidos biológicos**, conseguido durante la estancia internacional de 6 meses realizada en la Universidad de California San Diego supervisada por el Prof. Joseph Wang.

2.2. Biosensado electroquímico en el campo clínico y alimentario. Antecedentes bibliográficos

Actualmente, los biosensores representan herramientas analíticas prometedoras en los campos clínico, agroalimentario o medioambiental por su aplicabilidad directa, rápida y fiable para el análisis de biomarcadores [Monosika, 2012]. Son indicadores del auge y grado de desarrollo de estas técnicas para biosensado, su aceptación e introducción en nuestra sociedad, el creciente número de entidades destinadas a su investigación, su transferencia, el desarrollo de dispositivos comerciales y su impacto en la economía mundial.

Los biosensores han atraído la atención de la comunidad científica e industrial, combinando de manera ingeniosa habilidades interdisciplinarias de biología, física, química e ingeniería, con objeto de proporcionar soluciones innovadoras y eficientes a los problemas analíticos actuales. Se espera que el mercado de biosensores crezca por encima del 9 % en los próximos años, convirtiéndose así en uno de los sectores de mayor crecimiento en el mundo. Resulta destacable, además, el aumento significativo de inversión en este campo en todo el mundo, a partir de las investigaciones llevadas a cabo en universidades, centros tecnológicos o compañías privadas [Mongra, 2012].

Las principales razones que justifican su imparable crecimiento se deben a la falta de metodologías de bajo coste y manejo sencillo, rápidas, sensibles y aplicables en diferentes entornos que permitan la determinación/detección específica de biomoléculas en áreas como la medicina, la alimentación, la agricultura, el medio ambiente y la seguridad. Además, las prestaciones analíticas y versatilidad de estas metodologías han permitido la comercialización de muchas de ellas y la detección “*in situ*” de biomarcadores [Arduini, 2016], [Bahadir, 2015]. Históricamente, Clark y Lyons demostraron por primera vez el desarrollo de un biosensor, basado en la integración de una enzima en un electrodo, para la monitorización simple, rápida y robusta de glucosa [Mehrvar, 2004]. Posteriormente, en 1973, Yellow Springs Instruments comercializó un biosensor de glucosa. A partir de entonces se ha producido un crecimiento exponencial en el desarrollo de plataformas biosensoras comerciales de construcción simple y miniaturizada, ideales para la detección fiable de biomarcadores a los niveles de sensibilidad y selectividad clínicos requeridos, en el punto de atención. Estos

dispositivos se han aplicado, a día de hoy con éxito en el campo clínico, a la detección de una amplia variedad de metabolitos (lactato, colesterol y creatinina), de hormonas en pruebas de embarazo (hCG), de virus y bacterias patógenas (*Escherichia coli* O157, virus de la influenza A y B, *Helicobacter pylori*, virus de la inmunodeficiencia humana adquirida, tuberculosis y malaria), en medio ambiente, en seguridad alimentaria y en bioterrorismo [Bahadir, 2015].

Brevemente, un biosensor es un dispositivo capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa utilizando un elemento de reconocimiento de origen biológico, inmovilizado en una superficie transductora [Arduini, 2016]. Atendiendo al tipo de biomolécula empleada como elemento de bioreconocimiento, se pueden clasificar fundamentalmente en: biosensores enzimáticos, inmunosensores, biosensores de ácidos nucleicos o de células enteras [Alhadrami, 2018]. Las técnicas más comunes empleadas para la inmovilización de biomoléculas incluyen: adsorción física, entrecruzamiento, atrapamiento (mediante membranas o matrices sol-gel), enlace covalente o alguna modificación o combinación de estas técnicas; resultando una etapa clave que asegura la estabilidad y sensibilidad de los biosensores desarrollados [Mehrvar, 2004], [Ali, 2017]. Dichas técnicas serán descritas en detalle en los siguientes apartados para la inmovilización de anticuerpos o secuencias de oligonucleótidos, bioreceptores empleados en las plataformas biosensoras de afinidad desarrolladas en el marco de esta Tesis Doctoral. La interacción entre el elemento de bioreconocimiento y el analito diana origina un cambio en las propiedades del medio, consumo de materia o formación de un producto. Los transductores convierten estos cambios físicos, químicos y/o biológicos ocurridos en su superficie en una señal cuantificable. Atendiendo a la técnica empleada para la transducción de la señal, los biosensores pueden clasificarse en: ópticos, de masa, bioluminiscentes, electroquímicos o térmicos [Mehrvar, 2004], [D'Orazio, 2003].

Los biosensores, de carácter interdisciplinario, son actualmente una de las áreas de investigación más activas en química analítica, destacando su empleo para biosensado en ausencia o tras pretratamientos mínimos de muestra, resultando competitivos con otras metodologías disponibles, fundamentalmente en términos de coste, tiempo de ensayo, facilidad de uso, sensibilidad, reproducibilidad, precisión, selectividad frente a interferentes, estabilidad operacional y de almacenamiento y compatibilidad con su empleo en continuo y/o en entornos descentralizados [Ronkainen, 2010].

En particular, los biosensores electroquímicos, al combinar las ventajas inherentes de la transducción electroquímica con la especificidad de los procesos de reconocimiento biológico, se ofrecen como alternativas muy interesantes [Ronkainen, 2010]. Este tipo particular de biosensores presenta ventajas competitivas en comparación con otros biosensores y/o metodologías convencionales, en términos de rapidez, simplicidad, bajo coste, bajos volúmenes de muestras, consumo energético despreciable y compatibilidad con multiplexado a diferente nivel molecular, miniaturización y uso en entornos descentralizados y/o de recursos limitados [Campuzano, 2018], [Wang, 2006-b]. Cabe destacar en este punto también, que la detección electroquímica no se ve afectada por componentes de la muestra como cromóforos, fluoróforos o partículas en suspensión, que a menudo interfieren en las principales técnicas ópticas, permitiendo su aplicación directa en fluidos complejos, coloreados o turbios, como saliva, sangre entera o matrices alimentarias [Ronkainen, 2010].

Los biosensores electroquímicos se pueden dividir en dos categorías principales atendiendo a la naturaleza de los procesos de reconocimiento biológicos:

- **Biosensores de tipo catalítico:** estos sensores incorporan componentes biológicos tales como enzimas, células enteras o tejidos que reconocen el analito de interés produciendo especies electroactivas o algún otro producto detectable electroquímicamente. Estos dispositivos utilizan principalmente enzimas que, gracias a sus complejas estructuras moleculares, a su elevada actividad biocatalítica y exquisita especificidad, permiten detectar el sustrato enzimático directamente en matrices complejas, como orina o sangre, de forma muy selectiva, reduciendo en gran medida el tiempo y la complejidad del análisis, por la minimización o eliminación de etapas previas para el aislamiento o extracción del analito de interés. Muchas enzimas también incorporan pequeños grupos químicos no proteicos, como cofactores o grupos prostéticos en las estructuras de su sitio activo que contribuyen a su especificidad por el sustrato. Además, es posible modular su respuesta y/o especificidad empleando activadores e inhibidores, o mediante ingeniería genética. Las principales limitaciones de estos biosensores catalíticos se deben a la reducida estabilidad de las enzimas y a la dependencia de su actividad catalítica con factores como el pH, la fuerza iónica, la temperatura o agitación, y con procesos de inmovilización sobre superficies electródicas, lo que

hace necesario el empleo de modificadores electródicos como nanomateriales que permiten mejorar o flexibilizar los protocolos de inmovilización, además de facilitar la transferencia de electrones, o de polímeros comerciales, que las protegen en medios con valores de pH desnaturalizantes. Muchos analitos no son susceptibles de ser detectados por sensores enzimáticos debido a la falta de enzimas selectivas; es entonces cuando los biosensores de afinidad cobran importancia [Ronkainen, 2010], [Patel, 2016].

- **Biosensores de afinidad:** se basan en las interacciones selectivas, robustas y estables que se producen entre el analito de interés y las biomoléculas inmovilizadas en la superficie del elemento transductor, regidas por interacciones de afinidad, bajo consideraciones termodinámicas, como los enlaces antígeno-anticuerpo, hibridación de oligonucleótidos, o enlaces de tipo proteína-ácidos nucleicos [Ronkainen, 2010]. Los principales bioreceptores de afinidad utilizados incluyen anticuerpos, aptámeros o secuencias de oligonucleótidos (de diferente variedad natural, ADN o ARN, de cadena simple o doble, lineales o de tipo horquilla). La selección de estos bioreceptores depende de varios factores, como su disponibilidad comercial, el nivel molecular del analito de interés, y su tamaño y contenido endógeno. Se han empleado diferentes estrategias para la monitorización electroquímica de la interacción con el analito diana, como la detección electroquímica directa (si se trata de una molécula electroactiva), la medición de los cambios en la resistencia a la transferencia de electrones como consecuencia de interacciones biomoleculares, o estrategias indirectas que implican el etiquetado enzimático de los bioreactivos de afinidad con entidades redox externas. Los inmunosensores y biosensores de ácidos nucleicos electroquímicos se han empleado ampliamente en los campos clínico y agroalimentario por las ventajas que ofrecen en términos de sensibilidad y selectividad, precisión, exactitud, bajo coste, mínimo requerimiento de muestra, simplicidad de operación y posible integración en dispositivos analíticos compactos. A lo largo de este apartado se comentarán los aspectos más relevantes de las características, tipos y técnicas de inmovilización empleadas en el desarrollo de inmuno- o genosensores. Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN artificiales de cadena sencilla que normalmente se pliegan en una estructura tridimensional y cuya conformación se modifica cuando interactúan con el analito diana. Además de su elevada afinidad y especificidad, sus

principales ventajas residen en la facilidad para producirse y modificarse con entidades redox, con un coste de producción relativamente bajo, además de ser más estables a la desnaturalización y degradación que los anticuerpos [Campuzano, 2017-a].

Las reacciones electroquímicas implicadas generalmente en el funcionamiento de estos biosensores de afinidad generan, habitualmente, una variación de corriente o de potencial o una acumulación de carga o variación de las propiedades conductivas, por lo que las técnicas electroquímicas empleadas más comúnmente para la transducción son las amperométricas, voltamperométricas, potenciométricas y conductimétricas. Aunque también se han empleado otros tipos de técnicas como las impedimétricas y transistores de efecto de campo (FET). Teniendo en cuenta que estas reacciones electroquímicas se detectan generalmente sólo en las proximidades de la superficie del electrodo, estos desempeñan un papel crucial en las prestaciones de los biosensores, resultando de gran relevancia tanto el material (comúnmente compuestos de platino, oro, carbono o silicio), como sus dimensiones y nanoestructuración [Grieshaber, 2008].

A continuación, se detallan algunas características específicas de los biosensores en función de la técnica electroquímica empleada para la transducción:

- **Biosensores amperométricos:** se basan en la monitorización de la corriente resultante de la oxidación o reducción de una especie electroactiva, generada/implicada en los procesos de bioreconocimiento, a un potencial constante. La variación de la corriente obtenida resulta directamente proporcional a la concentración del analito en un intervalo determinado. En la actualidad este tipo de biosensores electroquímicos están entre los más empleados y han demostrado elevada sensibilidad, amplio intervalo lineal y posibilidad de acoplamiento con estrategias novedosas de nanoestructuración [Grieshaber, 2008], [Wang, 1999]. Los biosensores amperométricos se basan, esencialmente, en el empleo de enzimas para la detección directa del analito de interés, o como entidades redox para el marcaje enzimático de los bioreactivos empleados para el reconocimiento de proteínas o secuencias de ácidos nucleicos. Comúnmente, se han empleado enzimas que consumen oxígeno (oxidasas), producen H_2O_2 , o indirectamente la forma reducida de la β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (deshidrogenasas). Las plataformas biosensoras amperométricas

desarrolladas en esta Tesis Doctoral están basadas en el empleo de las enzimas peroxidasa de rábano (HRP) y glucosa oxidasa (GOx), que oxida aeróbicamente la glucosa y genera H_2O_2 . La monitorización directa de la reducción enzimática (por parte de la HRP) del H_2O_2 a H_2O conllevaría el empleo de potenciales de oxidación o reducción muy elevados, lo que podría derivar en problemas de especificidad al existir varios compuestos que pueden co-oxidarse o reducirse a estos potenciales elevados. En este sentido, el empleo de mediadores ha demostrado ser una solución eficiente para minimizar estos problemas, ya que facilitan la transferencia electrónica, permitiendo operar a potenciales de trabajo inferiores. Pese a las desventajas de la detección indirecta, estos dispositivos amperométricos ofrecen una sensibilidad superior a los dispositivos potenciométricos [Grieshaber, 2008], [Prodromidis, 2002].

- **Biosensores potenciométricos:** se basan en la monitorización de cómo varía el potencial de un electrodo de trabajo en comparación con el de un electrodo de referencia, en una celda electroquímica, cuando la corriente entre ellos es nula, lo que proporciona información sobre la actividad de los iones en una reacción electroquímica, regida por la ecuación de Nernst. La potenciometría es uno de los métodos instrumentales más antiguos, basados en el empleo de instrumentación de bajo coste y posibilidad de fabricación en masa. A día de hoy, el acoplamiento de biomoléculas con estas técnicas electroquímicas amplía significativamente el espectro de analitos susceptibles de detección y mejora la selectividad en la detección, debido a la elevada especificidad de las interacciones biomoleculares. Otros subtipos de potenciometrías que cabe destacar son las basadas en FET para medir cambios en los valores de pH, en las concentraciones de iones selectivos y en la cinética de las reacciones biocatalíticas [Grieshaber, 2008], [Koncki, 2007].
- **Biosensores impedimétricos:** la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) combina el análisis de las propiedades resistivas y capacitivas de los materiales, a través de la perturbación de un sistema en equilibrio por una señal de excitación sinusoidal de pequeña amplitud. Es una técnica que ha demostrado resultar muy valiosa para la caracterización, análisis y estudio de recubrimientos, baterías, celdas de combustible, fenómenos de corrosión, de cinética de electrodos y de conductividad de polímeros o tejidos. Para el desarrollo de biosensores impedimétricos se han empleado enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, células y microorganismos. En general estos procesos de reconocimiento molecular

aumentan la resistencia a la transferencia electrónica hacia la superficie del electrodo, y pueden realizarse en ausencia (impedancia no faradaica) o en presencia (impedancia faradaica) de un sistema redox reversible (generalmente $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$). Estos últimos se han empleado para el estudio de los procesos de bioreconocimiento como consecuencia del impedimento estérico causado por las interacciones biomoleculares y/o por la repulsión electrostática entre las cargas de las moléculas diana, o de la superficie electródica, y las del sistema redox seleccionado [Guan, 2004], [Bahadir, 2016], [Grieshaber, 2008].

A continuación, se comentarán los aspectos más relevantes de las plataformas biosensoras desarrolladas hasta el momento de redacción de esta Tesis Doctoral, para su aplicación en el campo clínico y/o agroalimentario, discutiendo los formatos de inmuno- y genoensayos disponibles, las técnicas más comúnmente empleadas para la inmovilización de enzimas, anticuerpos y secuencias de nucleótidos, en el desarrollo de estos dispositivos. Se prestará especial atención a los dispositivos y/o metodologías compatibles con miniaturización y uso descentralizado, basadas en el empleo de electrodos serigrafiados desechables o dispositivos portátiles para uso corporal, que permitan la monitorización de biomarcadores de interés en el punto de atención.

2.2.1. Biosensores electroquímicos para seguridad alimentaria

El concepto de seguridad alimentaria surgió en la década de los 70, definiéndose como “la producción y disponibilidad alimentaria a nivel global y nacional”. Dicha definición se ha ido modificando o adaptando a los nuevos tiempos, incorporándose la idea del acceso, tanto económico como físico, en los años 80, hasta el concepto actual que incorpora la inocuidad y las preferencias culturales, reafirmando la seguridad alimentaria como un derecho humano. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) “la seguridad alimentaria a nivel de individuo, hogar, nación y global, se consigue cuando todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a suficiente alimento, seguro y nutritivo, para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias, con el objeto de llevar una vida activa y sana”.

A día de hoy, una de las principales prioridades de las autoridades y de los profesionales del campo agroalimentario, es garantizar la seguridad alimentaria, asegurando la inocuidad de los alimentos y la ausencia de patógenos, alérgenos, adulterantes, toxinas y otros contaminantes prohibidos [Campuzano, 2016]. Existen diversos factores que dificultan la seguridad alimentaria, como el continuo crecimiento de la población, la creciente competencia por la tierra, el agua y la energía, la sobreexplotación de los recursos alimentarios, la necesidad urgente de reducir el impacto del sistema alimentario en el medio ambiente y la influencia del cambio climático en la industria alimentaria [Godfray, 2010]. Es por ello que el control de nutrientes y la detección rápida y eficaz de contaminantes representan algunos de los temas clave en el campo agroalimentario para asegurar la calidad de los alimentos, por lo que existe una demanda urgente para desarrollar dispositivos analíticos simples, rápidos, precisos, de bajo coste y portátiles; en la actualidad se considera que los biosensores resultan potencialmente atractivos para solucionar esta problemática [Rotariu, 2016].

Durante décadas, la química electroanalítica ha desempeñado un papel fundamental en la evaluación de la inocuidad y la calidad de los alimentos. En la actualidad, la evolución y aplicación de métodos electroquímicos en el campo agroalimentario es evidente. Esto se debe, en gran medida, a la elevada especificidad de los procesos de bioreconocimiento junto con la posibilidad de emplear una instrumentación sencilla, robusta, de fácil manejo, bajo coste y con una elevada versatilidad para el desarrollo de dispositivos portátiles y/o automáticos, para la determinación, individual o múltiple, de biomarcadores. Estos dispositivos permiten la aplicación directa en muestras complejas o turbias en el punto de atención, en las granjas o campos de producción, durante el transporte, procesado, envasado y distribución de los productos o su uso doméstico [Campuzano, 2017-a], [Palchetti, 2008], [Pilolli, 2013]. En la actualidad, los biosensores electroquímicos desarrollados para seguridad alimentaria se pueden clasificar en potenciométricos, amperométricos, voltamperométricos o impedimétricos, y están basados en el empleo de enzimas, anticuerpos, secuencias de ADN o ARN de cadena sencilla o doble, aptámeros y células enteras [Campuzano, 2016].

Al igual que en otros campos, los biosensores enzimáticos fueron los primeros que se introdujeron en la industria agroalimentaria para la monitorización de glucosa,

alcohol, colesterol, etc. Sin embargo, los biosensores de afinidad, basados en el empleo de anticuerpos o secuencias de oligonucleótidos, cobran cada vez mayor importancia en esta industria, por su elevada sensibilidad para la determinación de componentes principales y secundarios que permiten evaluar la frescura o calidad de los alimentos, su propio origen geológico o filogenético, la detección de adulteraciones o la identificación a niveles de trazas de micotoxinas, alérgenos, residuos de medicamentos o microorganismos patógenos [Campuzano, 2017-a].

Teniendo en cuenta la importancia del desarrollo y empleo de inmunosensores y genosensores electroquímicos en el campo agroalimentario y los objetivos principales de esta Tesis Doctoral, a continuación, se discuten los aspectos más generales de inmuno- y geno-sensores electroquímicos y del estado del arte en su aplicación al campo agroalimentario.

2.2.1.1. Inmunosensores

Un inmunosensor es un subtipo de biosensor donde el elemento de reconocimiento biológico utilizado es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, aprovechando su elevada afinidad de unión con su antígeno específico. Esta capacidad se ha empleado ampliamente en el desarrollo de ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISAs), que en la actualidad es la tecnología más comúnmente empleada para la determinación de proteínas. Muchos inmunosensores adaptan formatos similares a los ELISAs, con la diferencia que en un inmunosensor electroquímico es necesario generar un compuesto electroquímicamente activo para la monitorización del analito de interés. Por ello, habitualmente, se lleva a cabo la modificación de los anticuerpos de detección con marcadores redox, empleando convencionalmente fosfatasa alcalina (AP, por sus siglas en inglés) o peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) para el marcaje enzimático de los inmunoreactivos empleados. A pesar de las similitudes entre ambas metodologías, mientras que la determinación en la metodología ELISA se lleva a cabo en una solución homogénea, para un inmunosensor electroquímico ocurre en la interfase electrodo/solución, lo que puede tener una influencia significativa en las adsorciones inespecíficas de cualquier entidad biológica que ocurren durante la determinación [Duffy, 2017].

Brevemente, los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs ~ 150 kDa) son glicoproteínas séricas que intervienen en los mecanismos de defensa del sistema inmunitario. Se pueden clasificar en cinco tipos en función de la estructura de su región pesada (IgM, IgD, IgG, IgE e IgA). La estructura básica de las IgGs se puede dividir en la región de unión al antígeno (Fab) y la fracción constante (Fc). Las IgGs están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas (dos cadenas pesadas de ~50 kDa y dos cadenas ligeras de ~25 kDa) unidas entre sí por enlaces disulfuro. La cadena pesada se compone de una región variable (V_H) y tres regiones constantes, y la cadena ligera tiene una región variable (V_L) y una región constante. Las regiones variables se unen para formar los dominios de unión específicos al antígeno [Sharma, 2016]. Habitualmente, los antígenos presentan numerosos epítomos que son reconocidos por un gran número de linfocitos, generando la producción de múltiples anticuerpos que reconocen distintas zonas del analito, denominados como policlonales. Por el contrario, los anticuerpos monoclonales son producidos por un único clon de linfocitos B, gracias a la metodología desarrollada por Köhler y Milstein a mediados de los años 70 como resultado de la fusión de células B con células de mieloma [Lipman, 2005].

Para la fabricación de inmunosensores, la selección de anticuerpos policlonales o monoclonales depende de una serie de factores, siendo limitante su disponibilidad comercial. Generalmente, los policlonales pueden producirse de manera más rápida y económica. Las principales ventajas de los monoclonales son su elevada homogeneidad, de gran utilidad para evaluar los cambios en la conformación molecular, interacciones proteína-proteína, estados de fosforilación y para identificar a los miembros individuales de las familias de proteínas. Sin embargo, también puede limitar su utilidad para el desarrollo de inmunosensores, ya que pequeñas modificaciones en la estructura del epítomo, pH o fuerza iónica pueden afectar notablemente la interacción antígeno-anticuerpo, no resultando tan significativa la alteración de estas variables cuando se emplean anticuerpos policlonales. Otra ventaja clave del empleo de anticuerpos monoclonales, es su producción constante e invariable una vez generado el hibridoma (línea celular híbrida inmortal obtenida mediante la fusión de un linfocito B productor del anticuerpo específico de interés, con una línea celular de mieloma); sin embargo, la expresión y/o afinidad de anticuerpos policlonales puede variar entre diferentes producciones [Lipman, 2005].

Teniendo en cuenta la variabilidad de inmunoreactivos disponibles, los inmunosensores pueden clasificarse en:

- **Inmunosensores electroquímicos directos:** estos inmunoensayos están basados en el empleo de transductores potenciométricos, capacitivos, impedimétricos y amperométricos para la evaluación directa de la unión antígeno-anticuerpo a partir de las variaciones de las densidades de carga, conductividades o resistencias a la transferencia de carga para la transducción, sin necesidad de emplear compuestos redox auxiliares. Resultan especialmente atractivos para la monitorización “*in vivo*”, permitiendo la determinación en tiempo real, evitando la inclusión de marcadores redox o sustratos enzimáticos que pueden afectar a los procesos biológicos, pueden ser fuente de irreproducibilidad por variación de condiciones experimentales y encarecen la determinación. Este tipo de inmunoensayos, sin embargo, están limitados por el peso molecular del analito de interés [Warsinke, 2000].
- **Inmunosensores electroquímicos indirectos:** en este caso la reacción de afinidad se monitoriza indirectamente a través de la conjugación de los inmunoreactivos involucrados con un compuesto redox auxiliar. A día de hoy se emplean, de forma general, enzimas para el marcaje enzimático de inmunoensayos, debido a su elevado poder catalítico y facilidad de monitorización de los productos de reacción mediante transductores potenciométricos, capacitivos o amperométricos. Resulta destacable la minimización de interferencias, debidas a la adsorción inespecífica de (bio)moléculas no electroactivas en comparación con las que pueden producirse en las metodologías directas [Warsinke, 2000].

De acuerdo con el formato empleado, los inmunosensores pueden clasificarse en competitivos o de tipo sándwich, seleccionándose entre los distintos formatos en función de la naturaleza y peso molecular del analito, de la disponibilidad de inmunoreactivos y de las prestaciones analíticas y operacionales que se pretenden alcanzar (sensibilidad, intervalo lineal, precisión, tiempo de ensayo, coste, etc.) [Darwish, 2006], [Warsinke, 2000].

- **Inmunosensores de tipo competitivo:** están basados en la competición del analito de interés por sitios limitados de unión del anticuerpo, obteniendo una dependencia inversa de la respuesta electroquímica con la concentración del analito. En función del bioelemento inmovilizado en la superficie transductora se pueden clasificar en:
 - **Competitivo directo:** basado en la inmovilización del anticuerpo en la superficie del transductor y la competición directa entre el analito y un análogo marcado, por las zonas limitadas de unión con el anticuerpo inmovilizado.
 - **Competitivo indirecto:** en este caso la superficie del transductor se modifica con el analito (antígeno) y se lleva a cabo la competición indirecta entre el antígeno libre en disolución y el inmovilizado, por su unión con una cantidad limitada de anticuerpo, también en disolución.
- **Inmunosensores de tipo sándwich:** este formato de inmunoensayo se emplea para analitos de elevado peso molecular, que presentan más de un epítipo de unión. En este caso se requieren dos anticuerpos, o un único anticuerpo policlonal, capaces de reconocer epítipos diferentes del antígeno diana. Uno de ellos se inmoviliza en la superficie del transductor para la captura del antígeno de interés, empleándose habitualmente un segundo anticuerpo, generalmente marcado, para la detección y obtención de la respuesta electroquímica, que en este caso resulta directamente proporcional a la concentración del analito.

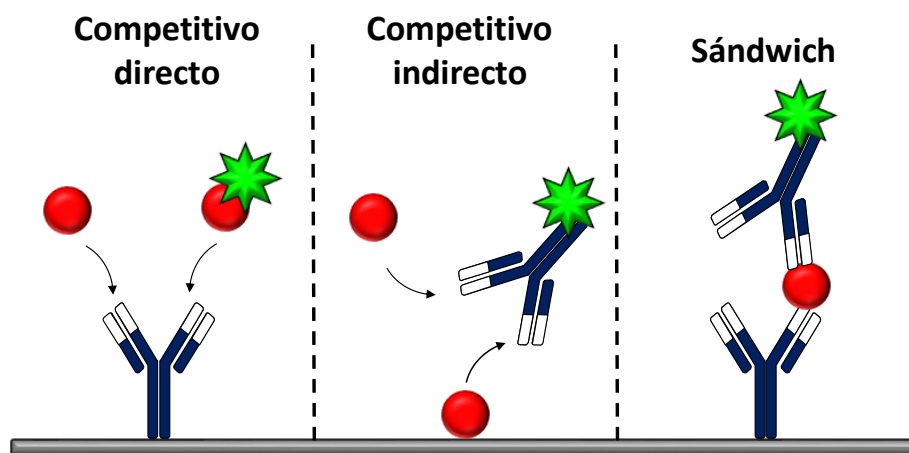


Fig. 2.1: Diagrama esquemático de los formatos de inmunoensayos tipo competitivo (directo e indirecto) o sándwich. Anticuerpos en azul, analito en rojo y marcaje en verde.

La sensibilidad de un inmunoensayo competitivo viene determinada esencialmente por la afinidad anticuerpo-antígeno, requiriéndose el empleo de concentraciones limitantes de anticuerpo para favorecer la competición. Sin embargo, en los inmunoensayos tipo sándwich se utiliza un exceso significativo de anticuerpos, influyendo, en mayor medida, la difusión, que la afinidad del anticuerpo utilizado. Este tipo de formato, generalmente, ofrece mayor sensibilidad y selectividad que los formatos competitivos [Cox, 2015].

Además del formato de inmunoensayo, el tipo de inmovilización del elemento de reconocimiento en la superficie del electrodo, orientación y transferencia del producto enzima/sustrato hacia la superficie del transductor, son factores claves que determinan la sensibilidad del ensayo [Duffy, 2017]. Controlar la orientación y la química del acoplamiento de proteínas sobre superficies resulta fundamental para su funcionamiento óptimo. En concreto, la inmovilización de proteínas presenta mayores dificultades, debido a que esta puede modificar su estructura o disposición espacial, repercutiendo drásticamente en su funcionalidad. Por ello, a continuación, se van a discutir brevemente las principales estrategias empleadas para la inmovilización de proteínas, clasificadas en función de su orientación e interacciones establecidas a partir de la revisión llevada a cabo por Redeker y col., [Redeker, 2013].

- **Inmovilización no orientada no covalente:** basada esencialmente en la adsorción física de proteínas, anticuerpos o enzimas, mediante interacciones débiles como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y de Van der Waals. Este tipo de interacciones son las empleadas en la metodología ELISA, y destacan por su simplicidad, implicando solamente la deposición del bioreactivo sobre la superficie a modificar. Sin embargo, se obtiene una inmovilización no orientada, desordenada y heterogénea, que puede modificarse con el tiempo por la pérdida o desorción del bioelemento inmovilizado. Además, la ausencia de control en la inmovilización o interacciones producidas puede modificar u obstaculizar los sitios específicos de reconocimiento del elemento inmovilizado con el analito de interés. En este tipo de inmovilización la reacción de inmunoreconocimiento es fuertemente dependiente de factores como el pH, la temperatura o la fuerza iónica.

- **Inmovilización no orientada covalente:** en este caso se aprovechan los grupos reactivos de proteínas para establecer enlaces covalentes, dando lugar a interacciones fuertes, robustas y estables. Los grupos amino son empleados mayoritariamente para la inmovilización de proteínas mediante la unión covalente con grupos carboxílicos, empleando ésteres para su activación. Estos grupos existen tanto en los extremos amino de las cadenas polipeptídicas, como en los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina, aminoácido abundante en la mayoría de proteínas, que por lo general se disponen en la superficie exterior de las proteínas, estando accesibles para su anclaje a la superficie electródica sin que afecte a su estructura. También se emplean comúnmente los grupos tioles, grupos carboxílicos o los aminoácidos tirosina o triptófano, para la inmovilización de las proteínas. Teniendo en cuenta que cada proteína contiene múltiples aminoácidos o grupos reactivos, su interacción con la superficie del sustrato da lugar a una inmovilización no orientada, aunque de elevada estabilidad y robustez.
- **Inmovilización orientada no covalente:** a día de hoy, existe una gran variedad de estrategias para la inmovilización orientada no covalente de proteínas, basadas esencialmente en las interacciones de afinidad entre biomoléculas. Estas estrategias de inmovilización conllevan en muchos casos la fusión o modificación de proteínas con biomoléculas o dominios específicos de unión mediante ingeniería genética. Comúnmente se emplean proteínas modificadas con residuos ricos en histidinas, que reaccionan con iones metálicos divalentes, proteínas conjugadas genéticamente con péptidos para su interacción específica con anticuerpos o conjugadas directamente con biotina, glutatión, maltosa o quitina, o modificadas con secuencias sintéticas de oligonucleótidos, destacando además, el empleo de diferentes proteínas bacterianas, como las proteínas A y G, capaces de reconocer con diferente afinidad la región Fc de inmunoglobulinas de mamíferos, dejando libre y expuesta la región de reconocimiento del antígeno. Estas estrategias destacan esencialmente por la orientación del bioelemento de reconocimiento, que implica habitualmente la obtención de mayor sensibilidad y menor consumo de inmunoreactivos, además del empleo de protocolos de modificación más sencillos y rápidos [Conzuelo, 2014-b].
- **Inmovilización orientada covalente:** basada en el empleo de un grupo químico o aminoácido único en la proteína a inmovilizar para establecer la unión covalente. Para ello se pueden emplear los aminoácidos endógenos de las proteínas u obtener

zonas de anclaje específicas mediante ingeniería genética. En este caso, el grupo o aminoácido introducido idealmente no debería aparecer en los aminoácidos endógenos de la proteína, ni reaccionar con ellos, e influir mínimamente en la conformación de los sitios de unión antígeno-anticuerpo. En este contexto, las reacciones “click” se han vuelto extremadamente populares para la conjugación covalente y orientada de biomoléculas, destacando el empleo de condiciones de reacción leves, insensibilidad al oxígeno y al agua, permitiendo la formación de un producto estable en condiciones fisiológicas [Yáñez-Sedeño, 2018], [Yáñez-Sedeño, 2019-c]. Dentro de este grupo de reacciones podemos incluir las reacciones de cicloadición alcalina-ácida catalizada por cobre, cicloadición Diels-Alder, adiciones de tioleno y formación de oxima.

Es importante destacar, además, que con el fin de mejorar las prestaciones de las inmunoplateformas desarrolladas, se han empleado superficies electrónicas modificadas con distintos modificadores (nanomateriales, polímeros, etc.) o con monocapas autoensambladas (SAMs), basadas en la interacción estable de los grupos tioles con superficies de oro, para la inmovilización orientada de anticuerpos, controlando el espaciado entre los mismos. Así, se han explotado las extraordinarias propiedades eléctricas y mecánicas, y la elevada relación superficie/volumen que ofrecen los nanotubos de carbono o el grafeno para la inmovilización de biomoléculas, el empleo de nanopartículas metálicas para la catálisis de reacciones electroquímicas y la mejora de la transferencia de electrones, y de polímeros conductores, como el polipirrol y la polianilina, por su rápida transferencia de electrones, sensibilidad, especificidad y biocompatibilidad [Duffy, 2017]. También merece la pena destacar el empleo de partículas magnéticas funcionalizadas como soportes sólidos para la inmovilización de inmunoreactivos y su acoplamiento con electrodos impresos para realizar la transducción [Yáñez-Sedeño, 2016], [Serafín, 2017], [Kudr, 2018], [Pastucha, 2019].

Los diferentes tipos de inmunoensayos y estrategias de inmovilización comentadas anteriormente se han empleado en el desarrollo de inmunosensores electroquímicos con aplicabilidad en seguridad alimentaria para: i) determinar residuos farmacéuticos en productos alimentarios (esteroides anabólicos o antibióticos, empleados para potenciar el crecimiento y aumento de masa muscular del ganado, o tratar infecciones bacterianas, respectivamente) [Ricci, 2007]; ii) identificar microorganismos (como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*,

L. monocytogenes, *C. jejuni*, *Enterobacter sakazakii* o *Staphylococcus aureus* a través de la detección de toxinas, residuos o proteínas de membrana específicas de estos microorganismos) en agua o alimentos; iii) detectar toxinas, sustancias naturales producidas y secretadas por microorganismos, plantas o animales pero que pueden resultar dañinas para otros organismos (como el ácido domoico, las micotoxinas, las aflatoxinas o las ocratoxinas); y iv) residuos de pesticidas que se introducen en la cadena alimentaria por su bio-asimilación por plantas o vegetales [Campuzano, 2017-a], [Ricci, 2007].

El continuo crecimiento de la población mundial, el grado de industrialización del sector alimentario y el auge de enfermedades, como las alergias o los trastornos alimentarios, hace necesario el desarrollo de metodologías o dispositivos que permitan su detección fiable. Teniendo en cuenta estos antecedentes y los objetivos de esta Tesis Doctoral, se ha trabajado en el desarrollo y aplicación pionera de plataformas inmunosensoras para la determinación de alérgenos y fraudes alimentarios. Como muestra del estado del arte, se resumen en la Tabla 2.1 las características más relevantes de los inmunosensores electroquímicos descritos en los últimos años para la detección de alérgenos y de adulteraciones con otras especies de animales.

Para la determinación de alérgenos alimentarios se han empleado inmunosensores electroquímicos directos y libres de etiqueta, midiendo en presencia del sistema redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ la disminución de la respuesta obtenida por voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) tras la interacción anticuerpo-antígeno, para la determinación de caseína [Cao, 2011], β -lactoglobulina [Eissa, 2012], ovoalbúmina [Eissa, 2013] o gliadina [Chekin, 2016]. Todas estas inmunoplateformas están basadas en el empleo de electrodos nanoestructurados con fines de amplificación. Así, por ejemplo, se han empleado electrodos de carbono vitrificado (GCE) modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs), sobre los que se electropolimeriza una capa de poli(l-Arginina) para inmovilizar nanopartículas de oro (AuNPs) a través de su interacción con los grupos $-\text{NH}_2$. El electrodo resultante, doblemente nanoestructurado, se empleó para la inmovilización, por adsorción, del anticuerpo específico para caseína [Cao, 2011]. Se han empleado electrodos serigrafiados de carbono (SPCE) modificados con grafeno, sobre los que se han generado grupos carboxílicos mediante injertado electroquímico o “electrografting” usando para ello sales de diazonio, sobre los que se realiza la inmovilización covalente de los anticuerpos específicos para β -lactoglobulina

[Eissa, 2012] u ovoalbúmina [Eissa, 2013]. También se ha empleado grafeno para la modificación de GCE y su modificación posterior con ácido 1-pirenocarboxílico, para la generación de grupos carboxílicos a través de los que se inmoviliza covalentemente el anticuerpo específico de gliadina [Chekin, 2016].

Además, se han empleado estrategias inmunosensoras indirectas basadas en el empleo de HRP o AP para el marcaje enzimático de los inmunoreactivos empleados para la determinación de gliadina [Laube, 2011], ovoalbúmina [Cadková, 2015], Ara h 1 [Alves, 2015-a], Ara h 6 [Alves, 2015-b] o β -caseína [Molinari, 2015]. Para la determinación de Ara h 1 [Alves, 2015-a] y Ara h 6 [Alves, 2015-b] se han empleado inmunosensores basados en formatos de inmunoensayo tipo sándwich integrados en la superficie de electrodos serigrafiados modificados con AuNPs. Estas metodologías se basan en la inmovilización, por adsorción, del anticuerpo de captura sobre la superficie de los AuNPs-SPCE, en el empleo de anticuerpos de detección conjugados con AP y en la monitorización, mediante voltamperometría de redisolución anódica (ASV), de 3-indoxilo fosfato (3-IP) y Ag^+ . También se ha propuesto un inmunosensor de tipo competitivo indirecto empleando un anticuerpo conjugado con HRP e inmovilizando covalentemente la β -caseína sobre SPCE modificados con grupos carboxílicos tras un tratamiento con plasma de oxígeno [Molinari, 2015].

El empleo de MBs funcionalizadas con grupos tosilo [Laube, 2011] o carboxílicos [Cadková, 2015], [Angulo, 2019] para la inmovilización covalente del antígeno o anticuerpo de captura, también ha resultado exitoso para la determinación de gliadina u ovoalbúmina y tropomiosina, respectivamente. Se han empleado como transductores GCE [Laube, 2011], o electrodos serigrafiados de platino [Cadková, 2015] o carbono [Angulo, 2019] para monitorizar la reducción enzimática (HRP) del H_2O_2 mediada por HQ o tionina, empleando amperometría o voltamperometría de barrido lineal (LSV), respectivamente.

Sin embargo, como puede observarse en la Tabla 2.1 los inmunosensores electroquímicos se han explotado mucho menos para la detección de adulteraciones con distintas especies animales o vegetales, o productos de distinto origen animal. Esto puede atribuirse a la conservación de regiones de proteínas, tanto animales como vegetales entre distintas especies, que dificulta en gran medida su empleo como biomarcadores específicos. Recientemente se ha publicado el desarrollo de un inmunosensor de tipo directo para la detección de carne de cerdo, basado en el empleo

de SPCE modificados con nanofibras de carbono (CNF) y funcionalizados con grupos carboxílicos mediante injertado electroquímico con sales de diazonio, para la inmovilización del anticuerpo específico para albúmina de suero porcino, monitorizándose la reacción de afinidad antígeno-anticuerpo mediante DPV en presencia de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ [Lim, 2016]. Sin embargo, cabe destacar que esta metodología no se ha ensayado para la identificación real de carne de cerdo en otras matrices cárnicas a los niveles exigidos para la detección de este tipo de adulteraciones, y la imposibilidad de aplicación en muestras cárnicas procesadas donde la desnaturalización de las proteínas impide su reconocimiento. Es por ello que, como se comentará a lo largo de esta Tesis, el empleo de otros biomarcadores como las inmunoglobulinas o fragmentos específicos de ADN, por su mayor resistencia a la desnaturalización durante el procesado y su elevada especificidad, cobra cada vez mayor importancia para la identificación de especies.

Tabla 2.1. *Inmunosensores electroquímicos descritos para la determinación de alérgenos y adulteraciones con otras especies animales.*

Analito	Formato de inmunoensayo	Electrodo	Modificación electrodo	Estrategia de inmovilización	Marcaje enzimático	Técnica de detección	Muestra	LD	Referencia
Caseína	Directo	GCE	AuNPs/P-l-Arg/MWCNT	Adsorción	–	DPV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	Queso	5×10 ⁻⁸ g mL ⁻¹	[Cao, 2011]
Gliadina	Competitivo indirecto	GCE	–	MBs tosiladas	HRP	Amperometría H ₂ O ₂ /HQ	Leche y cerveza	12.5 ng mL ⁻¹	[Laube, 2011]
β-Lactoglobulina	Directo	SPCE	Grafeno e injertado electroquímico con sal de diazonio	Covalente	–	DPV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	Tarta de queso y galletas	0.85 pg mL ⁻¹	[Eissa, 2012]
Ovoalbúmina	Directo	SPCE	Grafeno e injertado electroquímico con sal de diazonio	Covalente	–	DPV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	Tarta	0.83 pg mL ⁻¹	[Eissa, 2013]
Ovoalbúmina	Sándwich	SPPtE	–	MBs carboxiladas	HRP	LSV H ₂ O ₂ /Tionina	–	5 nM	[Cadková, 2015]
Ara h 1	Sándwich	SPCE	AuNPs	Adsorción	AP	ASV 3-IP y Ag ⁺	Matrices alimentarias	3.8 ng mL ⁻¹	[Alves, 2015-a]
Ara h 6	Sándwich	SPCE	AuNPs	Adsorción	AP	ASV 3-IP y Ag ⁺	Matrices alimentarias	0.27 ng mL ⁻¹	[Alves, 2015-b]
β-caseína	Competitivo indirecto	8 SPCE en alúmina	Plasma de oxígeno	Covalente	HRP	Amperometría H ₂ O ₂ /HQ	–	~ppm	[Molinari, 2015]
Gliadina	Inmunosensor directo	GCE	Grafeno	Covalente	–	DPV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	Matrices alimentarias	1.2 ng mL ⁻¹	[Chekin, 2016]

Tabla 2.1 (continuación). Inmunosensores electroquímicos descritos para la determinación de alérgenos y adulteraciones con otras especies animales.

Analito	Formato de inmunoensayo	Electrodo	Modificación electrodo	Estrategia de inmovilización	Marcaje enzimático	Técnica de detección	Muestra	LD	Referencia
Tropomiosina	Sándwich	SPCE	–	MBs o MNPs carboxiladas	HRP	Amperometría $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HQ}$	Extractos proteicos	47 pg mL^{-1}	[Angulo, 2019]
Cerdo	Directo	SP(CNF)E	Injertado electroquímico con sal de diazonio	Covalente	–	SWV $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	Muestras cárnicas	0.5 pg mL^{-1}	[Lim, 2016]

ASV: voltamperometría de redisolución anódica, AP: fosfatasa alcalina, AuNPs: nanopartículas de oro, CNF: nanofibras de carbono, DPV: voltamperometría diferencial de impulsos, GCE: electrodo de carbono vitrificado, HQ: hidroquinona, HRP: peroxidasa de rábano, LSV: voltamperometría de barrido lineal, MBs: micropartículas magnéticas; MNPs: nanopartículas magnéticas, MWCNT: nanotubos de carbono de pared múltiple, p-l-Arg: poli(l-Arginina), SPCE: electrodo serigrafiado de carbono, SPPtE: electrodos serigrafiados de platino, SWV: voltamperometría de onda cuadrada, 3-IP: 3-indoxil fosfato.

2.2.1.2. Biosensores de ácidos nucleicos

Hoy en día, existe una preocupación pública creciente para la detección de patógenos, alérgenos, prácticas fraudulentas y modificaciones genéticas en alimentos. La legislación alimentaria exige cada día mayor nivel de protección de los consumidores garantizando el buen etiquetado de los productos. Sin embargo, el cumplimiento de estas demandas, cada vez más exigentes, requiere el desarrollo de dispositivos capaces de asegurar el cumplimiento de la legislación, sobre todo en aquellas aplicaciones donde las estrategias convencionales para la determinación de marcadores proteicos presentan algunas limitaciones, como en el análisis de alimentos procesados y la identificación de especies o modificaciones genéticas. Puesto que el ADN es una molécula más estable que las proteínas, está presente en la mayoría de tejidos tanto de origen vegetal como animal y su contenido puede amplificarse fácilmente, durante los últimos años ha crecido el interés en las estrategias capaces de determinar marcadores a nivel genético (reacción en cadena de la polimerasa (PCR), microarrays y genosensores) [\[Martín-Fernández, 2017\]](#).

Un genosensor está basado en el empleo de una secuencia generalmente sintética de ADN o ARN como bioelemento de captura, inmovilizada en la superficie de un transductor, capaz de hibridar por procesos de complementariedad de bases con el ácido nucleico diana a determinar [\[Campuzano, 2017-a\]](#). Los sensores electroquímicos de ácidos nucleicos combinan la gran especificidad de los procesos de hibridación con la elevada sensibilidad de los transductores electroquímicos [\[Drummond, 2003\]](#).

El ADN es un ácido nucleico natural que contiene las instrucciones genéticas para el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos y algunos virus. La función principal del ADN es el almacenamiento de la información genética para la síntesis de ARN o proteínas. El ARN es otra variedad natural de ácido nucleico formada por una cadena de ribonucleótidos. Está presente tanto en las células procariotas como eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus. Su función principal consiste en transferir la información del genoma para la síntesis de proteínas. Las secuencias de ácidos nucleicos están formadas por nucleótidos. Cada nucleótido está constituido por una base nitrogenada, una pentosa y un residuo de fosfato. Las bases nitrogenadas incluyen la adenina (A), la guanina (G), la citosina (C) y la timina (T) en el ADN, que se reemplaza por uracilo (U) en el ARN. La estructura primaria de los ácidos nucleicos

resulta de la unión covalente de los nucleótidos a través de enlaces fosfodiéster. La estructura secundaria tridimensional del ADN se debe a la formación de una doble hélice formada por dos hebras de polinucleótidos de sentido inverso, que se unen mediante enlaces de hidrógeno entre bases complementarias: A-T (o U para ARN) y C-G [Jonas, 2001].

Los contenidos de ARN y ADN descritos en alimentos están comprendidos entre (6.1–87.9) y (5.3–100.9) g Kg⁻¹ (materia seca) en tejidos animales, siendo más elevados en páncreas, riñones o hígado; (1.7–15.3) y (0.3–1.0) g Kg⁻¹ (materia seca) en pescado; (1.1–20.6) y (0.6–5.1) g Kg⁻¹ (materia seca) en vegetales y (16.0–66.2) y (0.6–6.0) g Kg⁻¹ (materia seca) en bacterias, levaduras y hongos, respectivamente. Sin embargo, la identificación únicamente de regiones específicas y la degradación de estas durante los procesos de extracción son algunas de las limitaciones para su empleo como biomarcadores para seguridad alimentaria [Jonas, 2001], [Herbel, 1987], [Lassek, 1990].

A día de hoy se han empleado varias estrategias para la detección electroquímica de ácidos nucleicos [Campuzano, 2017-a], [Drummond, 2003], [Wang, 2002]:

- **Detección directa:** estas estrategias están basadas en la reducción y oxidación directa de las bases nitrogenadas del ADN empleando electrodos de mercurio, para la monitorización de la cantidad de ADN o discriminación de secuencias sencillas o dobles empleando ASV. El principal inconveniente de estas metodologías es la necesidad de empleo de potenciales elevados que implican la necesidad de estrategias de aislamiento de la muestra, para reducir el número de interferencias, y evitar la destrucción de la muestra.
- **Detección indirecta:** estas estrategias implican la oxidación de ADN empleando mediadores redox como los complejos de polipiridilo de Ru(II) y Os(II) para la oxidación de guanina. Las desventajas de estos enfoques incluyen la dificultad de preparar las muestras y su destrucción tras la determinación.
- **Empleo de secuencias modificadas con etiquetas redox:** basadas en la modificación artificial de secuencias con marcadores redox. Entre las estrategias más comúnmente empleadas se encuentran aquellas basadas en formatos de hibridación tipo sándwich, que emplean dos secuencias sintéticas complementarias a la secuencia diana de interés, donde una de ellas, conocida

comúnmente como sonda de captura, se inmoviliza sobre la superficie del transductor y se emplea para capturar selectivamente el ácido nucleico diana y la otra, conjugada con el marcador redox, y denominada sonda de detección, se emplea para marcar y detectar de forma indirecta el ácido nucleico diana capturado. Esta hibridación con la sonda de detección elimina la necesidad de modificar la propia secuencia diana o su destrucción. Para el marcaje de las sondas de detección se ha empleado ferroceno, nanopartículas de oro o plata, puntos cuánticos (CdS, ZnS o PbS), polímeros, biotina/avidina o directamente enzimas como HRP, β -galactosidasa o AP [Wang, 2003].

- **Interacción de compuestos redox con ácidos nucleicos:** estas estrategias se basan en el empleo de compuestos redox capaces de asociarse de manera diferencial a secuencias de cadena sencilla o doble de ADN, mediante interacciones débiles no covalentes, como las interacciones electrostáticas entre complejos como el Co(phen)_3^{3+} o $\text{Ru(NH}_3)_6^{3+}$ con secuencias de cadena doble de ADN o la intercalación de compuestos redox, como el azul de metileno, en la estructura de doble hélice del ADN. Estas estrategias, que aprovechan las características inherentes del ADN para mediar en el transporte de cargas, facilitando la transducción, resultan muy sensibles para la detección de ciertas modificaciones en el ADN que incluyen: daños, errores, la presencia de bases desapareadas o el aglutinamiento de proteínas.

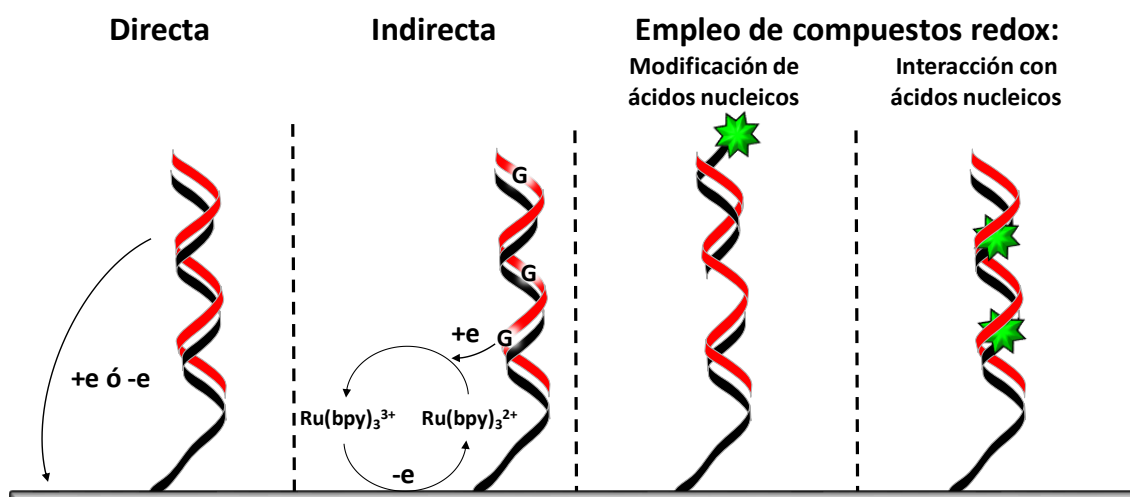


Fig. 2.2: Diagrama esquemático de las principales estrategias empleadas para la detección electroquímica de ácidos nucleicos: directa, indirecta o basadas en el empleo de compuestos redox (en verde) para la modificación de secuencias sintéticas o capaces de interaccionar con estas.

En la actualidad, el empleo de bioreceptores comerciales como proteínas virales o anticuerpos, con afinidades específicas para híbridos particulares de ARN (ARN/ARN, o ADN/ARN, respectivamente), ha demostrado ser una estrategia muy atractiva para el desarrollo de plataformas biosensoras que resultan muy competitivas para la determinación de ácidos nucleicos, de diferente naturaleza, en términos de sensibilidad, simplicidad y tiempo de ensayo. La gran afinidad de estos bioreceptores comerciales, dependientes de la longitud del híbrido, solo en el caso de las proteínas virales, e independiente de su secuencia, hace que estas estrategias resulten particularmente atractivas por combinar, en el mismo enfoque, dos reacciones de afinidad diferentes, ofreciendo una elevada versatilidad para la determinación de ácidos nucleicos de diferente naturaleza y para el desarrollo de plataformas para multideterminación [Campuzano, 2017-b]. Las estrategias desarrolladas recientemente incluyen el empleo de proteínas virales, como las proteínas dedos de zinc (ZFP), con afinidad hacia homo- (ADN-ADN, ARN-ARN) o hetero-híbridos (ADN-ARN), empleada como bioreceptor de detección [Fang, 2017], [Fang, 2018]; o de la proteína p19, que reconoce específicamente homohíbridos de ARN-ARN de 21-23 bp, empleada tanto como bioreceptor de captura [Campuzano, 2014] como de detección [Torrente-Rodríguez, 2014] para la determinación de microARNs, de gran relevancia en procesos cancerígenos. También se han desarrollado distintas estrategias para la determinación de ácidos nucleicos basadas en el empleo de un anticuerpo comercial específico (AbS9.6) capaz de reconocer con gran afinidad regiones del orden de 6 bp en heterohíbridos de ADN-ARN, independientemente de su secuencia. El pequeño epítipo que es capaz de reconocer este anticuerpo permite su empleo como bioreceptor de detección en estrategias de amplificación, y modular a voluntad la sensibilidad de la metodología desarrollada variando la longitud del heterohíbrido generado y marcando enzimáticamente dicho anticuerpo con anticuerpos secundarios o proteínas bacterianas conjugadas con una o múltiples moléculas de HRP [Campuzano, 2017-b]. De hecho, se han desarrollado recientemente en nuestro grupo de investigación estrategias muy competitivas basadas en el empleo de estos anticuerpos como bioreceptor de captura, inmovilizado de forma orientada sobre MBs funcionalizadas con proteína G [Torrente-Rodríguez, 2016-a], o de detección para la determinación de microARNs [Vargas, 2017] o fragmentos de ADN característicos de alérgenos [Pereira-Barros, 2019].

Como se comentó anteriormente para los inmunosensores, también en este tipo de biosensores de afinidad las estrategias empleadas para la inmovilización de las biomoléculas resultan determinantes para la sensibilidad y la selectividad de la metodología. Aunque existen algunas estrategias específicas para la inmovilización de oligonucleótidos, como su adsorción sobre polímeros cargados positivamente por interacciones electrostáticas con las cargas negativas del ADN, la posibilidad de obtener comercialmente secuencias de oligonucleótidos modificados a la carta con gran variedad de grupos reactivos (grupos carboxílicos, tioles, amino, etc.), fluoróforos (isotiocianato de fluoresceína (FITC)) o biomoléculas pequeñas (biotina y avidina), hace posible el empleo de estrategias de inmovilización similares a las ya comentadas anteriormente para la inmovilización de proteínas [Sassolas, 2008].

Tras el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha incrementado considerablemente el empleo de marcadores genéticos para seguridad alimentaria, debido a la mayor estabilidad del ADN a los tratamientos térmicos y la posibilidad de amplificar, de manera sencilla, el material genético presente en una muestra, permitiendo la detección de cantidades extremadamente bajas. Sin embargo, la necesidad de instrumentación costosa y dificultad de implementación en dispositivos en el punto de atención y/o automatizados, además de la mayor probabilidad de obtener falsos positivos, ha propiciado el desarrollo de estrategias alternativas para la detección de ácidos nucleicos [Martín-Fernández, 2017], [Mafra, 2008].

Estas características hacen que los genosensores electroquímicos se ofrezcan actualmente como una alternativa muy interesante a los enfoques ópticos o basados en espectrometría de masas para la detección de ADN, debido a la posibilidad de aplicación directa en matrices complejas y/o turbias, de manera sencilla y empleando dispositivos de bajo coste y portátiles, además de su compatibilidad para la implementación de dispositivos automáticos y miniaturizables. Sin embargo, la amplificación por PCR de la secuencia diana sigue siendo necesaria para lograr la sensibilidad y la selectividad que demanda la seguridad alimentaria [Pedrero, 2011], [Martín-Fernández, 2017]. A día de hoy, se están desarrollando diferentes métodos alternativos de amplificación de ácidos nucleicos basados en estrategias isotermas fácilmente implementables en dispositivos en el punto de atención, basadas en el empleo de enzimas, como las amplificaciones de círculo rodante (RCA), iniciada por polimerasa (SDA), dependiente de helicasa (HDA) o isotérmica mediada por bucles

(LAMP), o libres de enzima, como la reacción de hibridación en cadena (HCR) o el empleo de concatámeros de ADN. Otras técnicas de amplificación se basan en el empleo de enzimas como las ligasas que facilitan la unión de dos cadenas de ADN a través de la hidroxilación de ácidos nucleicos o las nucleasas, capaces de romper secuencias de ADN o ARN, al catalizar la formación de enlaces fosfodiéster [Miao, 2015].

Los genosensores electroquímicos se han aplicado ampliamente a la determinación de microorganismos [Campuzano, 2017-a], [Ricci, 2007], [Pedrero, 2011], y más recientemente, a la identificación de alérgenos, transgénicos y especies o fraudes alimentarios. En esta Tesis Doctoral, se han desarrollado, caracterizado y aplicado plataformas genosensoras para la detección de alérgenos y fraudes alimentarios.

En la Tabla 2.2 se resumen los aspectos más relevantes de los biosensores de ácidos nucleicos descritos recientemente para la determinación electroquímica de alérgenos e identificación de especies. Teniendo en cuenta que la mayoría de genosensores amperométricos desarrollados están acoplados a estrategias de amplificación del material genético mediante PCR o LAMP [Ahmed, 2010], resulta especialmente relevante el desarrollo de genosensores con diseños sencillos, capaces de hibridar de forma directa con los productos de la amplificación y detectar electroquímicamente este proceso. Las estrategias desarrolladas se basan en el empleo de secuencias tioladas o de mononocapas autoensambladas (SAMs) sobre electrodos de disco de oro [Sun, 2012], electrodos serigrafiados de oro [Bettazzi, 2008], [López, 2014], [Giallo, 2005], o GCE nanoestructurados (multicapas de Au-grafeno [Sun, 2015-a] y MWCNTs modificados con Au-quitano [Sun, 2015-b]). También se han desarrollado genosensores basados en el empleo de sondas sintéticas biotiniladas y MBs comerciales funcionalizadas con estreptavidina [Berti, 2009], [Pereira-Barros, 2019].

La monitorización de los procesos de hibridación, en los genosensores indicados anteriormente, se ha llevado a cabo mediante la oxidación directa de las guaninas presentes en la secuencia de interés, empleando voltamperometría de onda cuadrada (SWV), y sondas de captura modificadas con inosina (específicas para carne de vaca y oveja) [Mascini, 2005]. También se han utilizado estrategias indirectas basadas en el empleo del fluoróforo Hoeschst 33258 con actividad redox, monitorizándose en este caso la disminución de la intensidad de pico obtenido por LSV cuando se intercala en

secuencias de ADN de doble cadena, para la identificación de carne bovina [Chaumpluk, 2006] o carne de cerdo, pollo y vaca [Ahmed, 2010]. Otros enfoques descritos monitorizan, mediante EIS [Sun, 2012] o DPV [Sun, 2012], la transferencia de carga del par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ para la detección de cacahuete. Otras estrategias empleadas se basan en formatos de hibridación tipo sándwich con secuencias de detección modificadas con biotina, para el marcaje enzimático de los híbridos capturados con conjugados comerciales de estreptavidina (Estrep) con AP o HRP, empleando DPV o amperometría para la transducción, respectivamente. Estas estrategias se han desarrollado para la identificación de avellana [Bettazzi, 2008], [Berti, 2009], cacahuete [Sun, 2015-b], [López, 2014], tomate [Pereira-Barros, 2019] o las diferentes familias de rape [Giallo, 2005].

Cabe destacar en este punto que el acoplamiento de genosensores electroquímicos con estrategias de amplificación del material genético mediante PCR, hace que la sensibilidad de la plataforma resultante recaiga fundamentalmente en la etapa de amplificación de los ácidos nucleicos. Por otro lado, el empleo de nanomateriales en general supone protocolos de síntesis y modificación laboriosos por parte de personal especializado. Estos inconvenientes han llevado al desarrollo, durante esta Tesis Doctoral, de una nueva generación de plataformas electroquímicas con prestaciones analíticas mejoradas, sin necesidad de emplear nanomateriales y/o etapas de amplificación de ácidos nucleicos. Así, por ejemplo, a partir de la tecnología puesta a punto en esta Tesis Doctoral, se ha desarrollado recientemente una metodología que permite la detección de un fragmento característico que codifica la proteína alergénica Sola 1 7 del tomate. La metodología desarrollada está basada en el empleo de MBs funcionalizadas con estreptavidina para la captura de heterohíbridos de 60 bp formados entre la secuencia de ADN diana con sondas sintéticas de ARN biotiniladas de captura y de detección de 30-mer cada una. Los heterohíbridos formados son reconocidos por un anticuerpo comercial específico a heterohíbridos de ADN-ARN y marcado enzimáticamente mediante su incubación previa con un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Las MBs resultantes se capturan magnéticamente sobre la superficie del electrodo de trabajo del SPCE, y se monitoriza por amperometría la reducción enzimática del H_2O_2 mediada por la HQ. La plataforma desarrollada se ha aplicado de manera satisfactoria al análisis del ADN genómico sin fragmentar extraído de maíz y tomate (piel y semillas) [Pereira-Barros, 2019].

Tabla 2.2. Biosensores electroquímicos de ácidos nucleicos descritos para la determinación de alérgenos e identificación de especies.

Analito (<i>Gen diana</i>)	Electrodo	Estrategia de inmovilización	Marcaje enzimático	Amplificación	Técnica de detección	Muestra	LD	Referencia
Avellana <i>Cor a 1.03</i> y <i>Cor a 1.04</i>	SPAuE	SAMs	AP	PCR	DPV	Matrices alimentarias	0.3 y 0.1 nM	[Bettazzi, 2008]
Avellana <i>Cor a 1.04</i>	SPCE	Estrep-MBs	AP	PCR	DPV	Matrices alimentarias	0.2 nM	[Berti, 2009]
Cacahuete <i>Ara h 1</i>	Au	SAMs	–	PCR	EIS [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	Leche de cacahuete	0.35 fM	[Sun, 2012]
Cacahuete <i>Ara h 1</i>	GCE	Multicapa de Au-grafeno	–	PCR	DPV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	Leche de cacahuete	0.041 fM	[Sun, 2015-a]
Cacahuete <i>Ara h 1</i>	GCE	Au/quitosano/ MWCNTs	HRP	PCR	Amperometría H ₂ O ₂ /HQ	Leche de cacahuete	1.3·10 ⁻¹⁷ M	[Sun, 2015-b]
Cacahuete <i>Ara h 2</i>	SPAuE	SAMs	AP	PCR	DPV	–	10 pM	[López, 2014]
Tomate <i>Sola 1 7</i>	SPCE	Estrep-MBs	HRP	–	Amperometría H ₂ O ₂ /HQ	Extractos vegetales	0.2 pM	[Pereira-Barros, 2019]
Carne bovina	SPCE	–	H33258	PCR	LSV	Carne y piensos	2.69 %	[Chaumpluk, 2006]
Rape	SPAuE	SAMs	AP	PCR	DPV	–	–	[Giallo, 2005]
Vaca y oveja	SPCE	Adsorción	–	PCR	SWV	Muestras cárnicas	3 µg mL ⁻¹ , 30 µg mL ⁻¹ ADNt	[Mascini, 2005]
Cerdo, pollo y vaca	SPCE	–	H33258	LAMP	LSV	Matrices alimentarias	20.33 ng mL ⁻¹ , 78.68 y 23.63 pg mL ⁻¹	[Ahmed, 2010]

Tabla 2.2 (continuación). Biosensores electroquímicos de ácidos nucleicos descritos para la determinación de alérgenos e identificación de especies.

AP: fosfatasa alcalina, DPV: voltamperometría diferencial de impulsos, EIS: espectroscopia de impedancia electrónica, Estrep-MBs: MBs funcionalizadas con estreptavidina, GCE: electrodo de carbono vitrificado, HQ: hidroquinona, HRP: peroxidasa de rábano, H33258: 2-(4-hidroxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5-bi(1H-benzimidazol), LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucles, LSV: voltamperometría de barrido lineal, MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple, PCR: reacción en cadena de la polimerasa, SAMs: monocapas autoensambladas, SPAuE: electrodo serigrafiado de oro; SWV: voltamperometría de onda cuadrada.

2.2.2. Plataformas electroanalíticas para análisis rutinarios y/o descentralizados de biomarcadores de interés clínico

Hoy en día, la detección temprana de muchas enfermedades, como el cáncer, resulta determinante para el tratamiento eficiente de la enfermedad y para mejorar las tasas de supervivencia y la calidad de vida de los pacientes, por lo que la sociedad persigue el desarrollo de dispositivos que resulten compatibles con las demandas de la clínica actual, en términos de rapidez de respuesta, sencillez de manejo y coste asequible, y que permitan la determinación rutinaria de biomarcadores de diagnóstico temprano en entornos descentralizados y por usuarios no especializados. Estas novedosas herramientas analíticas no pretenden desbancar a las metodologías convencionales establecidas para la detección de enfermedades, sino complementar la información que proporcionan estas con objeto de mejorar la fiabilidad del diagnóstico y pronóstico clínicos [Wang, 2006-b], [Yáñez-Sedeño, 2019-a].

La posibilidad de monitorización continua y directa de biomarcadores en fluidos biológicos está revolucionando actualmente el diagnóstico clínico, permitiendo un gran avance en la detección y tratamiento eficiente de enfermedades y abriendo una nueva dimensión en la medicina personalizada [Campuzano, 2019-a].

En este sentido, los biosensores electroquímicos se ofrecen como alternativas muy interesantes para desarrollar dispositivos que permitan la monitorización individual o multiplexada de biomarcadores de forma rutinaria y en el punto de atención [Wang, 2006-b], [Yáñez-Sedeño, 2019-a]. Es importante destacar, en este punto, la necesidad de disponer de metodologías compatibles con su aplicación directa para la determinación de biopsias líquidas, mínimamente invasivas, como el suero. El suero es la muestra biológica de referencia, ya que contiene la mayoría de biomarcadores de interés y los niveles de los mismos están bien establecidos en este fluido biológico. Sin embargo, la detección directa en suero implica la necesidad de personal sanitario para su extracción y manipulación, por lo que cada día cobran mayor interés otro tipo de biopsias líquidas, menos invasivas como la saliva, la orina, el sudor, las lágrimas, etc. [Yáñez-Sedeño, 2019-a].

En la actualidad, los biosensores electroquímicos desarrollados para la determinación de biomarcadores de relevancia clínica se basan mayormente en el empleo de electrodos serigrafiados (SPEs). Esta tecnología apareció en 1990, imitando los procedimientos de serigrafiado empleados en la industria textil y publicitaria. Además de su fabricación con bajo coste y en masa, los SPEs presentan ventajas únicas para el desarrollo de dispositivos portátiles y desechables, como una elevada versatilidad para su producción con diferentes diseños, tanto para aplicaciones individuales como de multiplexado, con diferentes materiales, en función de los requerimientos de la sociedad, y en sustratos tanto rígidos como flexibles que permiten su adaptación a superficies tridimensionales de nuestro cuerpo. Además, se ha demostrado ampliamente su utilidad para la inmovilización de biomoléculas tales como enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, o elementos de reconocimiento sintéticos como los polímeros de impronta molecular. Hasta el momento, varios biosensores basados en el empleo de SPE se han comercializado para la determinación de metabolitos como glucosa, lactato, piruvato, colesterol, etanol, creatinina, glutamato, colina, acetilcolina, etc. [Arduini, 2016], [Li, 2012].

Por otro lado, la integración de sensórica en dispositivos imprescindibles en nuestra vida diaria se está incrementando con objeto de que proporcionen información útil sobre nuestro rendimiento y estado de salud. Los primeros desarrollos se centraron en sensores físicos para la monitorización de la movilidad y signos vitales, como el número de pasos, calorías quemadas o frecuencia cardíaca. En la actualidad están experimentando un cambio radical con el fin de abordar los principales retos sanitarios, como el control de la diabetes. Este desafío se pretende conseguir mediante el empleo de biosensores portátiles, de elevada robustez y estabilidad, basados en el empleo de enzimas para la monitorización de metabolitos, como la glucosa. Aunque su utilidad potencial es evidente, por el momento no se ha logrado una transferencia exitosa al mercado comercial, requiriéndose su validación clínica exhaustiva y su producción en masa [Kim, 2019].

La aplicación real de dispositivos portátiles para la monitorización de metabolitos en nuestro cuerpo requiere interfases enzima-electrodo con propiedades biocatalíticas controladas y flexibilidad mecánica. Estos dispositivos se basan comúnmente en la monitorización de la oxidación o reducción del analito mediada por enzimas, siendo uno de los factores clave la transferencia de electrones desde los sitios activos a la superficie

transductora, lo que depende en gran medida tanto de la enzima usada como de la estrategia empleada para su inmovilización [Kim, 2018]. En este punto cabe destacar que, en los denominados dispositivos portátiles, las estrategias empleadas tanto para la impresión de superficies electródicas, como para la inmovilización de la/s enzima/s, deben adaptarse al tipo de soporte diseñado para la monitorización de los analitos de interés, en las distintas zonas de nuestro cuerpo.

A continuación, se discuten los resultados más relevantes de algunas de las estrategias desarrolladas en los últimos años para el análisis mínimamente invasivo en fluidos biológicos, como sudor, lágrimas, saliva, etc., que minimizan los riesgos para la salud derivados de daños o infecciones en el área de actuación y por su facilidad de empleo [Kim, 2019]. Así, por ejemplo, SPE impresos en tereftalato de polietileno (PET) y acoplados a soportes nasales de gafas convencionales se han empleado como sustratos de (bio)sensores electroquímicos para la determinación de glucosa en lágrimas [Senior, 2014] o la multidetección de lactato e iones potasio en lágrimas, empleando transducción amperométrica y potenciométrica, respectivamente [Sempionatto, 2017]. Estos dispositivos emplean además conexión bluetooth para la adquisición de datos. También se han utilizado protectores bucales para la integración de biosensores amperométricos capaces de determinar ácido úrico directamente en muestras de saliva. Estos biosensores están basados en la modificación de SPE de carbono-Prussian Blue (PB), impresos sobre PET, con uricasa y glutaraldehído, y electrodepositando posteriormente una capa de o-fenilendiamina para la protección de la superficie biosensora de los procesos de bioensuciamiento en matrices complejas como la saliva [Kim, 2015].

Otra de las aplicaciones que superan las expectativas iniciales de estos dispositivos portátiles es la integración de biosensores en lentes que, estando en contacto directo y constante con las lágrimas basales, evitan la necesidad de su recolección y la irritación ocular. La puesta a punto de estos dispositivos se ha conseguido gracias al desarrollo de materiales blandos y flexibles en la fabricación de lentes y al grado de miniaturización de biosensores electroquímicos y dispositivos de alimentación y procesamiento de datos. Estos biosensores se han empleado para la determinación de glucosa a través de su interacción con la concanavalina A o derivados del ácido fenilborónico [Kim, 2019].

Para la monitorización continua de electrolitos o metabolitos en sudor, uno de los principales inconvenientes es la propia recolección del mismo. Algunos dispositivos emplean discos iontoforéticos que estimulan las glándulas sudoríparas con ayuda de una corriente eléctrica, sin embargo, tanto la generación de cantidad suficiente de sudor como cuestiones éticas relacionadas con la sensibilidad de ciertos sujetos, continúan siendo retos importantes a superar para conseguir la aceptación y aplicación generalizada de estos dispositivos. Se han empleado superficies sensoras de oro para correlacionar los niveles de glucosa en sudor y sangre, y para la detección de electrolitos o glucosa en sudor, para la monitorización de fibrosis quística [Emaminejada, 2017]. También se ha aprovechado la generación de sudor inducida por un esfuerzo físico, como alternativa a las técnicas iontoforéticas, principalmente para la monitorización de deportistas. Gao y col., emplearon esta estrategia para el desarrollo de dispositivos de (bio)sensado electroquímico para la determinación multiplexada de glucosa, lactato e iones sodio y potasio en sudor, y la monitorización de la temperatura corporal para la corrección de las respuestas amperométricas obtenidas en función de las condiciones físicas. Resulta destacable en esta estrategia la sinergia del empleo de superficies sensoras integradas en superficies de plástico flexibles, que permiten el filtrado de sudor hasta las superficies sensoras y su transducción y transmisión inalámbrica [Gao, 2016]. Las estrategias de detección en sudor se han empleado, además, para la monitorización del ritmo cardíaco y de lactato en sudor [Imani, 2016], y para controlar la diabetes en sudor mediante un parche elástico que integra (bio)sensores de temperatura, humedad, pH y glucosa, empleando dispositivos de grafeno dopado con oro (de elevada conductividad y flexibilidad), que permite además la administración de fármacos al fluido intersticial (ISF) a través de un sistema de microagujas capaces de activarse en función de los datos registrados [Lee, 2016].

Uno de los principales retos en el desarrollo de dispositivos portátiles de (bio)sensado es la determinación de proteínas o ácidos nucleicos empleando superficies inmuno- o genosensoras, debido a la dificultad de monitorización de las reacciones de bioreconocimiento de forma directa sin el empleo de etiquetas redox. No obstante, existen algunas aplicaciones basadas en este tipo de interacciones que implican, fundamentalmente, el empleo de los interruptores biomoleculares sintéticos, que incluyen ADNs, aptámeros y péptidos conjugados con moléculas redox, y que son capaces de cambiar reversiblemente, entre dos o más conformaciones, en respuesta al

reconocimiento de un ligando objetivo específico [Campuzano, 2019-a]. Se han desarrollado, por ejemplo, dispositivos basados en el empleo de seda hidrosoluble para la impresión de electrodos de grafeno y su posterior biofuncionalización con un péptido específico para el reconocimiento de bacterias como la *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* o *Staphylococcus aureus*. Estos dispositivos aprovechan la disolución de la seda sobre el esmalte dental, para la fijación y transferencia de la superficie sensora de grafeno, para la monitorización remota de bacterias directamente en saliva [Mannoor, 2012]. También se han empleado inmunosensores, basados en sustratos flexibles, para la deposición de oro mediante “sputtering” y su posterior modificación con ZnO para la inmovilización de anticuerpos específicos para la determinación electroquímica de interleucina-6 y cortisol, directamente en sudor [Munjel, 2017].

Aunque se ha progresado tremendamente en el desarrollo de plataformas inmuno- y genosensoras para la determinación de biomarcadores de interés clínico, empleando dispositivos portátiles con aplicabilidad en el punto de atención, su aplicación directa para la monitorización de biomarcadores en nuestro cuerpo sigue siendo un hándicap. También existen otro tipo de limitaciones técnicas en cuanto a la estabilidad operativa de estos dispositivos para la monitorización prolongada directamente en fluidos complejos, debido al (bio)ensuciamiento de las superficies sensoras, problemática para la que esta Tesis propondrá soluciones eficientes.

Frente al elevado grado de desarrollo de dispositivos portátiles para uso corporal, las aplicaciones biomédicas siguen dependiendo del uso de dispositivos de diagnóstico mínimamente invasivos e implantables, que requieren su inclusión, reemplazo o eliminación mediante intervenciones quirúrgicas. Es por ello que existe un interés creciente en el desarrollo de dispositivos ingeribles o implantables, basados en el empleo de (bio)materiales biocompatibles, biodegradables e inocuos [Kim, 2017], [Xu, 2017]. En este sentido, el grupo dirigido por el Prof. J. Wang, del Dpto. de Nanoingeniería de la Universidad de California San Diego, ha sido pionero en el desarrollo de (bio)sensores electroquímicos fabricados en su totalidad con elementos ingeribles. Esta nueva generación de sensores está basada en el empleo de carbono activo comestible, de bajo coste y con excelentes propiedades conductoras, como base junto con aceites comestibles (de oliva o maíz), empleados como aglutinantes, para la formación de pastas conductoras, que pueden empaquetarse en alimentos sólidos (verduras, frutos secos o pasta), dando lugar a plataformas sensoras totalmente

ingeribles, con propiedades para sensado electroquímico similares a las de pastas de carbono convencionales. Es importante destacar, además, que estas pastas pueden modificarse fácilmente mezclándose con extractos o tejidos vegetales (como hongos, plátanos, patatas o calabacines) ricos en enzimas, dotándolas de capacidad biocatalítica [Kim, 2017]. Estas pastas de carbono comestibles se han empleado también mezcladas con algas, queso y bebidas de polielectrolitos para el desarrollo de supercapacitores que aportan la energía necesaria para el funcionamiento de una cámara miniaturizada a partir del consumo de bacterias [Wang, 2016], o para el desarrollo de células de combustible basadas en el empleo de un ánodo y cátodo de pasta de carbono comestible mezclado con tejido de hongos (para la oxidación de etanol) o extracto de manzana (para la reducción del O_2) [Jeerapan, 2018-a]. Estos nuevos dispositivos fabricados con productos alimentarios se ofrecen como extremadamente prometedores para la generación de dispositivos ingeribles e inteligentes, con autonomía suficiente para la monitorización de biomarcadores en el tracto digestivo.

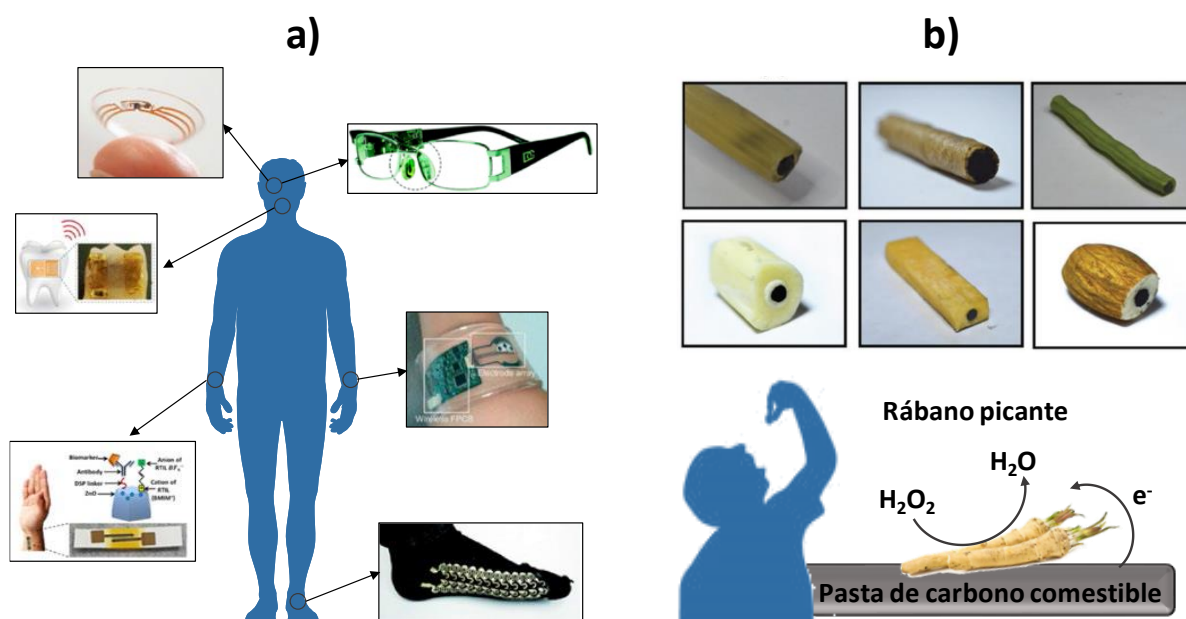


Fig. 2.3: a) Dispositivos (bio)sensores portátiles para la monitorización de marcadores de interés clínico. En sentido de las agujas del reloj en a): sensores para electrolitos y metabolitos en sudor integrados en gafas (adaptado de [Sempionatto, 2017]), dispositivo iontoforético con sensores integrados para el análisis multiplexado en sudor (adaptado de [Emaminejada, 2017]), biosensores de sudor impresos en tejidos (adaptado de [Jeerapan, 2016]), inmunosensores para diagnóstico portátil en sudor (adaptado de [Munjel, 2017]), sensor de bacterias integrado en el esmalte dental (adaptado de [Mannoor, 2012]), plataforma inteligente de biosensores de glucosa integrados en lentes de contacto para el análisis de lágrimas (adaptado de [Senior, 2014]). b) Diagrama esquemático de una plataforma sensora ingerible basada en una pasta de carbono comestible con actividad biocatalítica tras modificación con rábano picante (adaptado de [Kim, 2017]).

2.3. Evolución de la electroquímica en el análisis de muestras de elevada complejidad

El gran avance y la modernización de la instrumentación analítica han simplificado significativamente la necesidad de aplicar metodologías complejas y laboriosas para el pretratamiento de las muestras, antes de su análisis. Sin embargo, el análisis directo de muestras complejas sigue siendo el cuello de botella en el desarrollo de metodologías analíticas. En particular, la determinación de analitos a niveles de traza, como la detección de alérgenos en muestras alimentarias o de biomarcadores de interés clínico en fluidos biológicos, exige el empleo de distintos protocolos para la extracción, aislamiento y/o preconcentración del analito diana. Por todo ello, existe una demanda creciente para el desarrollo de técnicas analíticas que permitan su aplicación directa en matrices o fluidos complejos, simplificando y reduciendo el tiempo de análisis y disminuyendo los errores asociados a todas estas etapas previas [Souza-Silva, 2015].

En este sentido, y como ya se ha mencionado anteriormente, las técnicas electroquímicas son susceptibles de aplicación directa al análisis de fluidos complejos, coloreados o turbios, como saliva, sangre, o matrices alimentarias, sin que exista una influencia significativa en la detección electroquímica, salvo por la presencia de componentes con actividad redox. Sin embargo, este último aspecto, que sí puede repercutir en la selectividad de la metodología, se aborda incorporando elementos de reconocimiento biológico [Ronkainen, 2010].

La evolución de las técnicas electroanalíticas en el análisis de muestras complejas ha ido de la mano de la incorporación de bioelementos en su fabricación. Brevemente, el primer concepto de biosensor surge en 1962 con el desarrollo de un biosensor enzimático de glucosa, que se comercializó una década después, en 1973, para la detección directa de glucosa en sangre, seguido de la introducción de los primeros inmunosensores electroquímicos en 1975. Durante la década de los 80 se introdujeron nuevos conceptos para la transducción, como los dispositivos de fibra óptica y los piezoeléctricos. Resulta destacable, además, la introducción de tiras de glucosa, basadas en electrodos enzimáticos, junto con mediadores para su aplicación directa en sangre entera. Durante los 90 se desarrollaron los primeros dispositivos basados en el empleo

de microagujas de implantación subcutánea para el control de los niveles de glucosa de pacientes diabéticos, y desde entonces, este tipo de biosensores han experimentado un desarrollo tremendo en el análisis de metabolitos directamente en ISF. La aparición de la nanotecnología e introducción de genosensores, a finales de esta década, ha llevado al desarrollo de una gran variedad de biosensores con prestaciones electroanalíticas mejoradas y la inclusión de biomarcadores de naturaleza genética para la identificación de enfermedades y para garantizar la seguridad alimentaria. Este avance imparable está dando lugar a los dispositivos portátiles y/o implantables con capacidades tremendamente interesantes para la determinación directa de biomarcadores [Kim, 2019].

El progreso de las técnicas electroanalíticas, junto con la evolución de la propia sociedad, está introduciendo nuevos factores a considerar en el desarrollo de estas metodologías, como son la influencia del contacto directo de muestras complejas durante tiempos prolongados de análisis, o la necesidad de emplear materiales que no induzcan toxicidad o daños durante su aplicación “in vivo” en cultivos celulares, tejidos o nuestro propio organismo [Barfidokht, 2014]. En este sentido, y debido al incremento de la concienciación social, otro de los factores básicos a tener en cuenta en el desarrollo de la nueva generación de biosensores, es su implementación bajo los estándares de química verde, siendo respetuosos con el medio ambiente y evitando el empleo o formación de sustancias peligrosas y/o tóxicas durante su fabricación y/o aplicación [Yáñez-Sedeño, 2019-b].

Teniendo en cuenta las nuevas limitaciones que deben afrontarse en el desarrollo de plataformas biosensoras electroquímicas y los objetivos principales de esta Tesis Doctoral, a continuación, se van a comentar algunos de los problemas más comunes a enfrentar en el (bio)sensado electroquímico directo en matrices complejas.

2.3.1. Relevancia y problemática a resolver en el análisis directo de biomarcadores en muestras complejas

La posibilidad de monitorizar analitos específicos en tiempo real, de forma continua y directa, puede revolucionar el diagnóstico clínico, la seguridad alimentaria y la industria farmacéutica. En este contexto, la determinación en tiempo real de sustancias tóxicas, aditivos ilegales, alérgenos, residuos de plaguicidas o productos intermedios de reacción resulta especialmente interesante, ya que permitiría identificar y descartar las materias primas contaminadas antes de su empleo en la industria alimentaria. En el campo clínico, la posibilidad de rastrear “in vivo” los niveles de fármacos, metabolitos, hormonas y otros biomarcadores, permitiría avanzar en la capacidad de detección y tratamiento a tiempo de distintas enfermedades, abriendo una nueva dimensión en la medicina personalizada [Campuzano, 2019-a].

En este punto, y con el fin de obtener una visión general de su importancia y problemática asociadas, es importante tener en cuenta las diferentes opciones de empleo de las plataformas biosensoras para la monitorización de (bio)marcadores:

- **Monitorización “off line”:** métodos basados en la extracción de una alícuota o fracción de muestra significativa para su posterior tratamiento o análisis fuera de la matriz u organismo a evaluar.
- **Monitorización “in vivo”:** estrategias basadas en el empleo de dispositivos implantables capaces de detectar de manera directa y continua cambios extracelulares en la concentración del analito de interés.
- **Monitorización “on-line”:** métodos basados en el acoplamiento de dispositivos sensores con sistemas de muestreo implantables, que permiten la recolección directa y continua de la muestra y su transporte hasta la superficie sensora, como es el caso de sondas de microdiálisis o microagujas.

Aunque podría catalogarse como el procedimiento de análisis menos directo, la monitorización “off line” es la empleada, más comúnmente, para la determinación de biomarcadores en los campos clínico y alimentario. De hecho, la imposibilidad de realizar el análisis directo de ciertos biomarcadores, debido a su asociación y/o encapsulamiento con otras proteínas y/o vesículas en fluidos biológicos reales, la dificultad de implantación de dispositivos en ciertas zonas de nuestro organismo, o

simplemente, la ausencia de interés en la monitorización continua de ciertos biomarcadores, contribuyen a que los dispositivos “off line” portátiles sean los mayoritariamente empleados en la actualidad.

En cuanto a la monitorización “in vivo”, cada vez está cobrando mayor interés, pero el carácter invasivo de estos dispositivos implantables limita su uso principalmente a la investigación preclínica en modelos animales. Además, la heterogeneidad y variabilidad de los fluidos biológicos, así como la existencia de reacciones bioquímicas complejas, como la coagulación de la sangre o variaciones puntuales de la composición química, temperatura, concentración de iones o pH, puede influir drásticamente en la actividad de las biomoléculas, como las enzimas, empleadas en la fabricación de biosensores. En este sentido, la monitorización “on-line” permite la detección en continuo de (bio)marcadores y el control del fluido analizado con los dispositivos de muestreo, pudiendo emplearse para la dilución de la propia muestra o exclusión de algunos componentes por tamaño, carga, etc. [Rocchitta, 2016].

Con vistas a la monitorización directa y en tiempo real de las reacciones específicas entre biomoléculas, la nueva generación de biosensores debe tener en cuenta una serie de factores clave para su aplicación exitosa, que incluyen: i) la elevada selectividad en entornos biológicos, ii) la posibilidad de detección directa sin adición de reactivos exógenos, y iii) su funcionamiento continuo, reversible y estable tras la exposición prolongada a fluidos biológicos [Campuzano, 2019-a].

En este sentido, el funcionamiento continuo en matrices biológicas sigue siendo uno de los retos importantes a solventar debido a los fenómenos indeseables de pasivación de la superficie del transductor por la acumulación de (bio)moléculas de la matriz de la muestra, del propio analito diana o de productos derivados de las reacciones de bioreconocimiento o electroquímicas implicadas en su determinación. Estos fenómenos de (bio)ensuciamiento, que implican habitualmente la adsorción, polimerización o precipitación de (bio)moléculas inespecíficas como fenoles, aminoácidos, neurotransmisores, proteínas, células (enteras o fragmentadas) y ácidos nucleicos (ADN o ARN), inhiben el contacto directo del analito diana con la superficie del electrodo y/o la transferencia de electrones, lo que afecta gravemente a las características analíticas de los (bio)sensores, fundamentalmente en términos de sensibilidad, reproducibilidad, estabilidad y fiabilidad [Campuzano, 2019-b], [Barfidokht, 2014], [Wisniewski, 2000].

Entre los principales componentes presentes en matrices alimentarias y/o fluidos biológicos que pueden causar interferencia, pasivación y/o bioensuciamiento de las superficies electródicas se incluyen: ácidos (ácido ascórbico, ácido úrico o ácido homovanílico) y bases oxidables (catecolaminas e indolaminas), residuos farmacéuticos, metabolitos, proteínas (en altas concentraciones pueden adsorberse no específicamente en la superficie del transductor y en bajas concentraciones pueden interferir en la detección), pequeñas moléculas solubles en agua (como azúcares) y compuestos hidrofóbicos (como lípidos). Además, la presencia de elevadas concentraciones de cationes mono- y di-valentes en este tipo de matrices, pueden activar o inhibir muchas enzimas, actuando como efectores alostéricos sin participar en la reacción enzimática, o alterando su conformación y/o actividad biocatalítica [Rocchitta, 2016].

Algunas matrices alimentarias como la leche, contienen algunos de los componentes ya citados anteriormente como proteínas, ácido ascórbico o lactoperoxidasa, que pueden afectar directamente a la detección electroquímica, debido a sus propiedades redox. Otro de los principales inconvenientes que limita a día de hoy el empleo directo de biosensores en el análisis agroalimentario, es el propio estado físico de las muestras y la necesidad de extracción y/o aislamiento de metabolitos, proteínas o ácidos nucleicos de matrices sólidas a disoluciones acuosas para su análisis. Hay que ser consciente, además, del elevado número de compuestos presentes en matrices alimentarias, que pueden interferir en la determinación. En particular, en procesos basados en el reconocimiento antígeno-anticuerpo, además de la propia reactividad cruzada con proteínas de estructura similar a la del analito diana, la presencia de compuestos fenólicos puede interferir en este reconocimiento, como ocurre en alimentos como el chocolate [Alves, 2015-a]. En cuanto a la determinación de ácidos nucleicos, los mayores inconvenientes vienen dados por la inhibición de las estrategias de amplificación del material genético, mediante PCR, por la precipitación o desnaturalización de los ácidos nucleicos o a la inhibición de la enzima polimerasa, fundamentalmente en extractos de origen vegetal, debido a la presencia de aceites y grasas [Ramos-Gómez, 2014], [Rossen, 1992]. En este sentido, y como se comentará a lo largo de esta Tesis Doctoral, el empleo de MBs como μ -soportes sólidos para la fabricación de biosensores también ha demostrado ser una estrategia muy atractiva para minimizar estos procesos de ensuciamiento de la superficie electródica, permitiendo la aplicación de los biosensores, basados en su uso, al análisis electroquímico de muestras

de elevada complejidad con sensibilidades mejoradas, tiempos de ensayo reducidos y mínima influencia de la matriz de la muestra. Estas ventajas se atribuyen a la elevada superficie de estas partículas micrométricas y a sus propiedades paramagnéticas, que permiten trabajar con ellas bajo agitación constante y recuperarlas de forma eficiente tras las etapas de lavado, lo que mejora la eficiencia y la cinética de los procesos de bioreconocimiento a la vez que minimiza las adsorciones inespecíficas sobre su superficie. Esta Tesis Doctoral ha explotado las posibilidades de estos biocaptadores magnéticos para el aislamiento eficiente de analitos diana de diferente nivel molecular en extractos con naturaleza, viscosidad, homogeneidad y complejidad muy variable, simplificando enormemente los procesos de análisis y allanando el camino de estas metodologías para el análisis directo y descentralizado, demandado actualmente en seguridad alimentaria.

En el análisis de fluidos biológicos es necesario tener en cuenta la composición específica de cada uno de ellos. Así, por ejemplo, la saliva está formada por diferentes cationes y aniones, compuestos de nitrógeno, metabolitos, Igs, proteínas y enzimas, pudiendo contener además bacterias y residuos sólidos de alimentos. La orina está constituida fundamentalmente por metabolitos e iones. La sangre entera, suero o plasma, contienen esencialmente glóbulos blancos y rojos, nutrientes, hormonas, electrolitos, residuos farmacéuticos y proteínas. Los fluidos extracelulares están formados esencialmente por iones, glucosa, aminoácidos, ATP, ácido ascórbico, dopamina y distintos metabolitos. Las lágrimas están compuestas principalmente por iones y metabolitos, y el sudor contiene mayoritariamente urea, ácido úrico, azúcar, ácido láctico, aminoácidos y amoníaco [Rocchitta, 2016]. Con objeto de minimizar los procesos de ensuciamiento de la superficie de los electrodos tras su contacto directo con fluidos biológicos, debidos a procesos de adsorción de proteínas de elevado tamaño y/o interacciones termodinámicas hidrofóbicas, hidrofílicas o por cargas, se emplean comúnmente disoluciones reguladoras suplementadas con tensioactivos o proteínas como BSA o caseína, con carga positiva y negativa (a pH fisiológico), respectivamente [Barfidokht, 2014].

Teniendo en cuenta los problemas descritos en el análisis directo en muestras de elevada complejidad y los objetivos de esta Tesis Doctoral, a continuación, se discutirán brevemente las estrategias empleadas en el desarrollo de biosensores electroquímicos para su minimización.

2.3.2. Estrategias antiensuciamiento en biosensado electroquímico

Es este apartado se recogen algunas de las estrategias empleadas para minimizar los procesos de ensuciamiento de plataformas (bio)sensores en el análisis directo de matrices de elevada complejidad. En concreto en esta Tesis Doctoral se ha abordado el problema seleccionando dos estrategias fundamentales:

i) el empleo de μ -partículas magnéticas (MBs) como soportes sólidos para la fabricación de inmunosensores o genosensores amperométricos para la determinación de alérgenos y fraudes alimentarios y

ii) el desarrollo de bioplataformas, en formatos integrados, modificando las superficies (bio)sensores con polímeros comerciales biocompatibles sensibles al pH y de disolución controlada, con el fin de protegerlas de adsorciones indeseables y/o procesos de desnaturalización de su actividad biocatalítica durante su operación en fluidos biológicos, ricos en proteínas y/o con valores de pH desnaturalizantes.

Los aspectos y aplicaciones más relevantes de estas estrategias se discutirán en las siguientes secciones.

2.3.2.1. Empleo de partículas magnéticas como soportes sólidos para la fabricación de biosensores

Como se ha comentado en apartados anteriores uno de los aspectos claves en la fabricación de biosensores son las estrategias seleccionadas para la inmovilización de los (bio)elementos de reconocimiento. En muchos casos, la inmovilización directa sobre la superficie del electrodo puede resultar compleja y/o laboriosa, dificultando su producción en masa. Es importante destacar, además, que el confinamiento de bioreceptores de reconocimiento en una superficie bidimensional, además de aumentar el impedimento estérico en las reacciones de bioreconocimiento, hace que la difusión del antígeno hasta la superficie sensora resulte un factor que limita en gran medida la cinética de estas reacciones. Además, la exposición de la superficie biosensora a sucesivas etapas de modificación y lavados, y su contacto directo con la matriz de la

muestra a analizar hace que estas bioplataformas desarrolladas en formatos integrados sean mucho más susceptibles de procesos de ensuciamiento o pasivación de su superficie, de su deterioro con el tiempo y número de etapas, comprometiendo significativamente su reproducibilidad y operatividad [Ricci, 2012].

Con el fin de superar todos estos inconvenientes, en los últimos años el empleo de partículas magnéticas (MBs) de tamaño micro- o nano-métrico se ha extendido ampliamente en la fabricación de biosensores. Esto se debe principalmente a la versatilidad, elevada superficie, estabilidad química y física, baja toxicidad y alta biocompatibilidad que ofrecen las MBs. Convenientemente modificadas permiten llevar a cabo todas las reacciones de bioreconocimiento sobre su superficie, en suspensión y sin necesidad de contacto con la superficie de los electrodos, que en este tipo de formatos se emplean sin modificar y únicamente en la etapa de transducción electroquímica, lo que evita su deterioro, ensuciamiento y/o pasivación [Pedrero, 2012], [Stanciu, 2009].

Brevemente, las MBs son partículas esféricas de tamaño micro- o nano-métrico constituidas por una dispersión de material con propiedades magnéticas. Para la fabricación de MBs se han utilizado ampliamente óxidos de hierro (Fe_3O_4) debido a su simple preparación y a sus excelentes propiedades superparamagnéticas. A día de hoy, existe una gran variedad en cuanto a tamaño, distribución, forma y composición (Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , Fe_3S_4 , $\text{MO-Fe}_2\text{O}_3$ donde $\text{M} = \text{Ni}, \text{Co}, \text{Zn}$, etc.) de MBs que pueden adquirirse comercialmente u obtenerse empleando protocolos bien establecidos [Stanciu, 2009]. Con fines bioanalíticos y con el fin de evitar su agregación, deterioro por oxidación, pérdida de propiedades magnéticas, dispersión cuando se exponen al aire, y biodegradación, se emplean fundamentalmente modificadas con agarosa, celulosa, sílice, silicona, vidrio poroso, mica o poliestireno para su recubrimiento y funcionalización posterior [Pedrero, 2012], [Stanciu, 2009]. Cabe destacar en este punto la disponibilidad comercial de una amplia batería de MBs con distintas funcionalizaciones que incluyen desde grupos funcionales carboxilo, amino, aldehído, hidroxilo, tiol o tosilo, hasta biomoléculas como estreptavidina o avidina, aptámeros, péptidos, anticuerpos biotinilados; proteínas bacterianas (Proteínas A de *Staphylococcus aureus* y G de *Streptococcus*) capaces de reconocer inmunoglobulinas de mamíferos por su región Fc; u otros ligandos de afinidad para la captura específica de proteínas recombinantes expresadas con etiquetas particulares (HaloTag, tag de histidinas, etc.) [Yáñez-Sedeño, 2016], [Pedrero, 2012].

En la actualidad las MBs se han empleado ampliamente:

1) en el desarrollo de plataformas inmuno-, apta- o geno-sensoras, basadas en la fabricación manual, mediante etapas consecutivas de incubación y lavado, aprovechando su sencillez de manipulación con ayuda de un concentrador magnético. Su versatilidad de funcionalización permite su aplicación al análisis simultáneo y múltiple de distintos analitos diana, gracias a la fabricación independiente de biocaptadores magnéticos y su integración en dispositivos para multiplexado [Reverté, 2016];

2) como transportadores biológicos de control magnético, en sistemas en flujo o dispositivos microfluídicos; y

3) para la modificación de nanomateriales, como materiales de carbono, polímeros o partículas metálicas, generando materiales híbridos con propiedades magnéticas de interés para su empleo como modificadores de electrodos o etiquetas avanzadas con fines de amplificación [Yáñez-Sedeño, 2016].

Conseguir establecer una preferencia en cuanto al tamaño de las MBs, en función de cada aplicación requerida resulta difícil, esencialmente por la ausencia de estudios comparativos inmovilizando un mismo bioreceptor. Recientemente, Serafín y col., llevaron a cabo el desarrollo y comparación de dos inmunosensores amperométricos tipo sándwich, sobre micro- y nano-partículas magnéticas, funcionalizadas con grupos carboxílicos. Aunque los resultados obtenidos no permiten establecer normas generales acerca de las prestaciones analíticas, aglomeración de las MBs o efecto de la matriz a analizar en función de los distintos tamaños de MBs empleados, resulta indiscutible la mayor dificultad en el control magnético de las partículas de tamaño nanométrico, que requiere en la mayoría de casos el empleo de centrífugas para su concentración y aislamiento, lo que dificulta en gran medida el desarrollo de estrategias de biosensado sencillas de aplicación en el punto de atención [Serafín, 2017].

El acoplamiento de los SPEs, como transductores electroquímicos, con el de las MBs ha contribuido en gran medida a mejorar el rendimiento de los biosensores electroquímicos. La forma plana de estos transductores facilita la incorporación de bioconjugados magnéticos por simple atracción mediante el empleo de un imán situado bajo el electrodo de trabajo. En la actualidad, debido a la versatilidad en el diseño y composición y a su posible producción en masa y de bajo coste, los SPEs son los recomendados para la mayoría de estas aplicaciones [Yáñez-Sedeño, 2016]. Entre las

principales ventajas que aporta el empleo de MBs en el desarrollo de biosensores resultan destacables [Ricci, 2012], [Pedrero, 2012], [Yáñez-Sedeño, 2016]: i) una sensibilidad mejorada, debido a la superficie tridimensional que ofrecen para la inmovilización de los bioreceptores; ii) una cinética más rápida de ensayo, puesto que los procesos de reconocimiento se producen con las MBs en suspensión y bajo agitación constante, sin estar limitados por la difusión del analito hasta la superficie sensora y iii) la minimización de las adsorciones inespecíficas que frecuentemente se producen en el análisis de muestras complejas, gracias a las etapas de lavado y concentración magnética.

Es importante destacar que todas estas ventajas se consiguen además sin necesidad de optimizar y emplear protocolos tediosos de modificación de superficies electródicas.

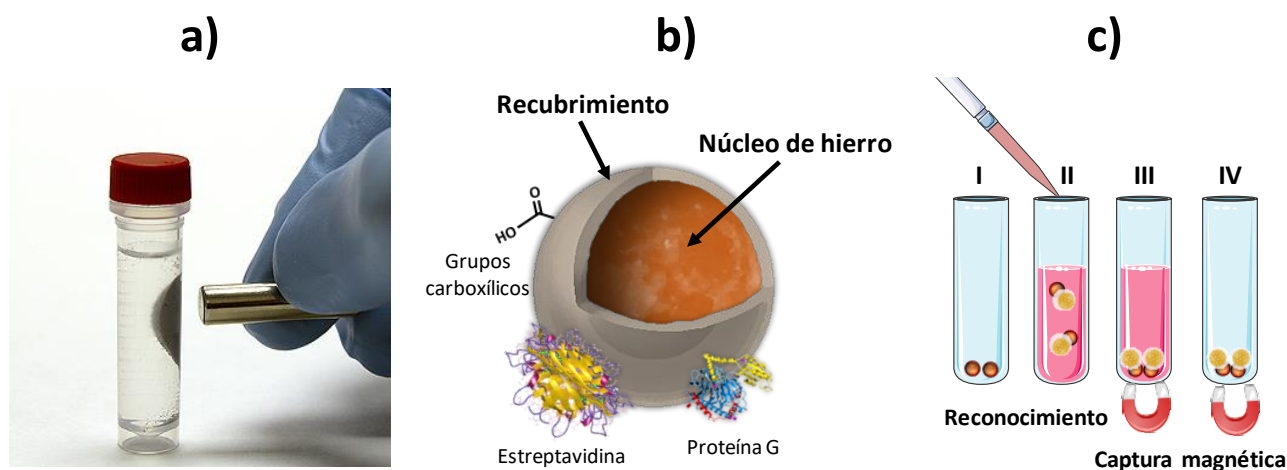


Fig. 2.4: a) Imagen real de la atracción de MBs comerciales con un imán de neodimio y diagramas esquemáticos b) de las partes principales y (bio)funcionalización de MBs y c) protocolo general de empleo de bioreceptores magnéticos para la captura del analito diana (I: bioreceptores magnéticos, II: incubación con el analito diana, III: captura magnética y IV: aislamiento de la matriz de la muestra).

A continuación, se discuten algunos de los trabajos más relevantes desarrollados en los últimos 5 años, basados en el empleo de MBs para la fabricación de plataformas biosensoras electroquímicas, haciendo especial hincapié en el tipo de funcionalización empleada y en su aplicación directa al análisis de muestras alimentarias y clínicas complejas.

Para el desarrollo de plataformas inmunosensoras electroquímicas se han empleado fundamentalmente formatos de inmunoensayo tipo sándwich y marcaje enzimático con HRP sobre MBs funcionalizadas con grupos carboxílicos, que se capturan magnéticamente sobre la superficie del electrodo de trabajo de SPCE para realizar la detección amperométrica (-0.20 V frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag) empleando el sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HQ}$. Entre las aplicaciones más relevantes de estos inmunosensores se incluye la determinación fiable de biomarcadores proteicos de gran relevancia clínica emergente en enfermedades oncológicas y cardiovasculares: lipoproteína (a) [Kaçar, 2015], ErbB2 [Eletxigerra, 2015], p53 [Pedrero, 2016], receptor de estrógeno α [Eletxigerra, 2016-a], receptor de progesterona [Eletxigerra, 2016-b], endoglina [Torrente-Rodríguez, 2016-d], receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos [Torrente-Rodríguez, 2017], cadherina-17 [Valverde, 2018-a], subunidad $\alpha 2$ del receptor IL-13 [Valverde, 2018-b] o E-cadherina [Muñoz-San Martín, 2019], en muestras de suero humano [Kaçar, 2015], [Eletxigerra, 2015], [Eletxigerra, 2016-a], [Eletxigerra, 2016-b], [Torrente-Rodríguez, 2016-d]; lisados celulares [Eletxigerra, 2015], [Pedrero, 2016], [Eletxigerra, 2016-a], [Eletxigerra, 2016-b], [Torrente-Rodríguez, 2017], [Valverde, 2018-a], [Valverde, 2018-b], [Muñoz-San Martín, 2019]; células intactas [Eletxigerra, 2015], [Eletxigerra, 2016-a], [Valverde, 2018-b], o extractos proteicos de tejidos humanos embebidos en parafina [Valverde, 2018-a], [Muñoz-San Martín, 2019]. También se han empleado estrategias análogas para la determinación de proteínas alergénicas presentes en alimentos como la tropomiosina en extractos de matrices alimentarias crudas o procesadas [Angulo, 2019] o de *Lactobacillus Rhamnosus* en productos lácteos [Xue, 2019]; o basadas en el empleo de MBs funcionalizadas con grupos tosilo para el desarrollo de inmunoensayos de tipo competitivo indirecto para determinar glicina en leche y cerveza [Laube, 2011].

En cuanto a la determinación de biomarcadores a nivel genético se han empleado MBs funcionalizadas con estreptavidina para la inmovilización de sondas sintéticas biotiniladas [Torrente-Rodríguez, 2016-b], [Vargas, 2017], [Vargas, 2018], [Povedano, 2018-a]; con quitina para la inmovilización de la proteína recombinante p19 [Torrente-Rodríguez, 2015]; con grupos carboxílicos para la inmovilización covalente de anticuerpos específicos a 5-metilcitosina (5-mC) o 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) [Povedano, 2018-a], [Povedano, 2018-b]; con proteína G para la inmovilización orientada de anticuerpos específicos a heterohíbridos de ADN/ARN [Torrente-

Rodríguez, 2016-a], para la detección de los marcadores epigenéticos de gran relevancia clínica como los microARNs [Torrente-Rodríguez, 2015], [Torrente-Rodríguez, 2016-a], [Torrente-Rodríguez, 2016-b], [Vargas, 2017], [Vargas, 2018] y las principales bases metiladas en ADN [Povedano, 2018-a], [Povedano, 2018-b], directamente en ARN total o ADN genómico extraído obtenidos de células [Torrente-Rodríguez, 2015], [Torrente-Rodríguez, 2016-a], [Torrente-Rodríguez, 2016-b], [Vargas, 2017], [Vargas, 2018], [Povedano, 2018-a], [Povedano, 2018-b] o de tejidos tumorales frescos o embebidos en parafina [Torrente-Rodríguez, 2015], [Torrente-Rodríguez, 2016-a], [Torrente-Rodríguez, 2016-b], [Vargas, 2017], [Vargas, 2018], [Povedano, 2018-b]; y directamente (sin extraer previamente el material genético) en muestras de suero [Povedano, 2018-b]; saliva u orina [Povedano, 2018-a]. También se han puesto a punto diversas plataformas genosensoras basadas en el empleo de MBs para la determinación de biomarcadores de relevancia en seguridad alimentaria, como MBs de sílica para la adsorción de los amplicones obtenidos por PCR para detectar la presencia de *Salmonella*, *Listeria* y *E. coli* [Liébana, 2016], [Brandão, 2015]; o funcionalizadas con estreptavidina para la detección de fragmentos característicos de los genes que codifican las proteínas alergénicas *Cor a 1.04* de la avellana [Berti, 2009] y *Sola l 7* del tomate [Pereira-Barros, 2019] en extractos de ADN genómico.

También se ha explotado la versatilidad que ofrecen las MBs para la determinación simultánea de marcadores de diferente nivel molecular [Torrente-Rodríguez, 2016-e] o rango clínico de interés [Esteban-Fernández de Ávila, 2014]. Así, por ejemplo, Torrente Rodríguez y col. [Torrente-Rodríguez, 2016-e] han desarrollado una plataforma electroquímica para la determinación simultánea de la proteína IL-8 y su ARN mensajero (ARNm) directamente en muestras de saliva para mejorar la fiabilidad en el diagnóstico del cáncer oral. Esta estrategia está basada en el empleo de MBs funcionalizadas con estreptavidina, para la inmovilización de una sonda biotinilada complementaria al ARNm, o con grupos carboxílicos para la implementación de un inmunoensayo tipo sándwich para la proteína (IL-8), llevándose a cabo la transducción amperométrica sobre SPCE duales y el sistema H₂O₂/HQ.

Para concluir este apartado es importante comentar también uno de los enfoques más atractivos desarrollados recientemente por Garranzo-Asensio y col., basado en la expresión, en un sistema libre de células (reticulocito de ratón), de proteínas, empleando la tecnología HaloTag y su inmovilización sobre HaloTag-MBs. Esta novedosa

estrategia se ha empleado satisfactoriamente a la determinación de autoanticuerpos séricos específicos frente a p53, demostrando resultar competitiva en términos de sensibilidad y selectividad con la metodología ELISA convencional disponible para la determinación de este tipo de autoanticuerpos [Garranzo-Asensio, 2016]. Los resultados descritos demuestran además que esta metodología podría trasladarse fácilmente a la determinación de autoanticuerpos frente a otros antígenos característicos de enfermedades cancerígenas, autoinmunes o alérgicas, sin necesidad de realizar optimizaciones particulares y reduciendo el coste y los falsos positivos de las determinaciones que se basan en el empleo de proteínas recombinantes producidas en huéspedes bacterianos.

2.3.2.2. Empleo de modificadores electródicos que imparten propiedades antiensuciamiento

En este apartado se van a resumir las estrategias disponibles para minimizar los procesos de (bio)ensuciamiento en (bio)sensado electroquímico, basadas en el empleo de (bio)materiales con propiedades antiensuciamiento como polímeros, hidrogeles, péptidos o monocapas tioladas [Campuzano, 2019-b].

- **Polímeros:** la diversidad y disponibilidad comercial de polímeros biocompatibles ha hecho posible su empleo para el recubrimiento de superficies biosensoras, minimizando su pasivación. Las estrategias empleadas aprovechan las propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas de los polímeros para la interacción con moléculas de H₂O y la formación de capas hidratadas, o para evitar la interacción con proteínas, respectivamente [Campuzano, 2019-b]. Las películas poliméricas también se han empleado para la inmovilización de enzimas mediante atrapamiento. Estas películas actúan como membranas selectivas, que evitan el paso de interferentes o analitos, con propiedades redox, a la superficie (bio)sensora, mediante interacciones por carga o tamaño, como ocurre en el caso del nafión, el acetato de celulosa o el poliestireno [Rocchitta, 2016]. El polímero más comúnmente utilizado para impartir propiedades antiensuciamiento es el poli(óxido de etileno) (PEO), también conocido como poli(etilenglicol) (PEG). Se trata de un poliéter disponible comercialmente en una amplia gama de pesos moleculares, que proporciona resistencia excelente a la adsorción de proteínas y a

la adhesión celular. De manera general, las superficies modificadas con PEG suelen ser altamente hidrofílicas, conteniendo grupos aceptores de enlaces de hidrógeno, y en general, eléctricamente neutras. Sus propiedades antiensuciamiento se atribuyen tanto al impedimento estérico, que evita el contacto directo entre las proteínas y la superficie subyacente, como a la repulsión inducida por la capa de hidratación formada [Barfidokht, 2014], [Campuzano, 2019-b]. Entre sus principales inconvenientes resultan destacables su baja estabilidad durante tiempos de operación prolongados y la reducción de la transferencia electrónica, que se traduce en una disminución de la sensibilidad. Por este motivo se han desarrollado estrategias para modificar PEG con materiales conductores o su empleo conjunto con polímeros conductores y/o porosos como el polipirrol, la polianilina o el PEDOT (polietileno (3,4-etilendioxitiofeno)) [Rocchitta, 2016] y sus derivados como el PEDOT-NaPSS (polietileno (3,4-etilendioxitiofeno-poli(4-estirenosulfonato de sodio)) [Yanga, 2013]. También está emergiendo recientemente el empleo de materiales con grupos zwitteriónicos biomiméticos, como la carboxibetaína, la sulfobetaína y la fosfocolina, debido a sus excelentes propiedades antiensuciamiento, carácter hidrofílico y biocompatibilidad. Resulta destacable entre este tipo de compuestos el metacrilato de policarboxibetaína, que además de presentar una elevada resistencia a la adsorción de proteínas, aporta abundantes grupos funcionales para la inmovilización de biomoléculas [Sun, 2018], y baja inmunogenicidad en comparación con el PEG, lo que hace compatible su empleo en aplicaciones “in vivo” [Campuzano, 2019-b].

- **Hidrogeles:** son estructuras tridimensionales, formadas esencialmente por enlaces químicos o físicos, que aumentan su volumen al hidratarse. Estos materiales, ampliamente utilizados para la fabricación de biosensores por sus excelentes propiedades antiensuciamiento, también presentan otras características que los hacen particularmente interesantes para el desarrollo de plataformas biosensoras electroquímicas, como la interacción con componentes biológicos a nivel molecular, el control de las propiedades viscoelásticas, la reacción a estímulos externos y la posibilidad de incorporar bioreceptores en su estructura y/o superficie [Tavakoli, 2017], [Campuzano, 2019-b]. Por su elevada biocompatibilidad y bajo coste, se han utilizado hidrogeles de origen biológico como alginato, quitina, quitosano, agarosa, celulosa, dextrano y ácido hialurónico

e hidrogeles electroconductores, que facilitan el transporte de electrones, como el polipirrol, la polianilina y el poli(etilendioxitiofeno). Este tipo de hidrogeles conductores se han empleado para la detección de vitaminas, glucosa, metabolitos, ADN, dopamina, péptidos, tumores o H_2O_2 [Tavakoli, 2017].

- **Péptidos y materiales modificados con péptidos:** otros candidatos atractivos para evitar el ensuciamiento son los péptidos, que son fáciles de diseñar y sintetizar y están compuestos de aminoácidos que actúan como moléculas zwitteriónicas en entornos biológicos. Aparte de su gran biocompatibilidad intrínseca, presentan un elevado carácter hidrofílico y carga neutra, que minimizan en gran medida las adsorciones inespecíficas de proteínas. Resulta destacable, además, la posibilidad de mejorar su rendimiento antiensuciamiento modificando su composición aminoacídica o estructura [Campuzano, 2019-b]. Gracias a estas propiedades, los péptidos se han empleado para la modificación de otros materiales antiensuciamiento como polímeros o hidrogeles, acoplándose por ejemplo a polímeros PEDOT [Wang, 2017] o a SAMs [Cui, 2017] para el desarrollo de plataformas geno- o apta-sensoras electroquímicas, respectivamente, para la determinación de biomarcadores de cáncer en muestras complejas como el suero humano.
- **Monocapas autoensambladas tioladas (SAMs):** basadas en la modificación de superficies de oro mediante la adsorción química de compuestos tiolados generalmente modificados con otros grupos funcionales en el otro extremo. Estas monocapas presentan una estructura ordenada gracias a las fuerzas de dispersión entre las cadenas hidrocarbonadas, quedando los grupos funcionales expuestos hacia el exterior. La posibilidad de seleccionar los grupos funcionales a voluntad y la elevada densidad de empaquetamiento (particularmente para compuestos de cadena larga) hace que estas estrategias también se ofrezcan como alternativas muy interesantes tanto para impartir propiedades antiensuciamiento a la superficie modificada, como para facilitar la inmovilización con biomoléculas para el desarrollo de biosensores [Emmenegger, 2009]. Algunas de las estrategias empleadas en la fabricación de SAMs con propiedades antiensuciamiento incluyen el empleo de grupos tioaromáticos, monocapas secundarias o terciarias, nanoestructuras tetraédricas de ADNs tiolados, alcanotioles modificados con 2-metacriloxietiloxietilcolina y oligonucleótidos, péptidos o polímeros tiolados [Campuzano, 2019-b].

Aunque a día de hoy se han desarrollado numerosas estrategias para minimizar las adsorciones inespecíficas o el (bio)ensuciamiento de superficies sensoras, en esta Tesis Doctoral se ha empleado un enfoque novedoso y atractivo que, en lugar de proteger al sensor durante su operatividad, evita procesos de adsorción indeseables durante su exposición prolongada al fluido biológico de interés. Esta estrategia se basa en el empleo de polímeros comerciales biocompatibles temporales, que se depositan sobre la superficie sensora y, tras su disolución completa y controlada en el (bio)fluido de análisis, permiten el contacto de la superficie (bio)sensora intacta con el mismo, en el momento de realizar la determinación. Para ello se han empleado los polímeros Eudragit, copolímeros basados en polimetacrilatos, comercializados principalmente por Evonik Industries, introducidos por primera vez en 1953 como polímeros alcalinos solubles y resistentes a fluidos gástricos. A partir de entonces se han desarrollado una amplia gama de productos derivados, como copolímeros aniónicos, catiónicos y neutros basados en ácido metacrílico y ésteres metacrílicos o acrílicos o sus derivados en proporciones variables. El control de su solubilidad, dependiente o independiente del pH, se ha explotado ampliamente en la industria farmacéutica para la liberación controlada de fármacos [Thakral, 2013], [Eudragit Evonic, p. web].

Estos polímeros se suministran comercialmente en diversas formas, como polvo seco, gránulos, dispersión acuosa o solución orgánica. Existen cuatro clases generales de polímeros Eudragit: Eudragit E, catiónico (soluble por debajo de pH 5.5); Eudragit L y S, aniónicos (solubles por encima de pH 6 y 7, respectivamente); Eudragit RL y RS de tipo neutro (solubilidad independiente del pH) y Eudragit NE y NM (hidratables y permeables). Algunas de las características específicas de los polímeros Eudragit L100 y E PO, empleados en esta Tesis Doctoral, se discuten brevemente a continuación. Los copolímeros de metacrilato de metilo y acrilato de etilo como componentes de éster con ácido metacrílico se utilizan como recubrimientos sensibles al pH, debido a la presencia de grupos carboxílicos en su estructura, que se transforman en carboxilatos en el intervalo de pH comprendido entre 5–7. En presencia de agua pura y ácidos diluidos forman una película insoluble, y además presentan una baja permeabilidad que permite la formación de recubrimientos aislantes de gran eficacia. El pH específico de disolución depende principalmente del contenido de grupos carboxílicos, permitiendo la diferenciación entre los polímeros Eudragit L (que se disuelve a $\text{pH} \geq 6$) o Eudragit S (que se disuelve a $\text{pH} \geq 7$). El Eudragit E es un polímero catiónico con base de

metacrilato de dimetilaminoetilo, metacrilato de butilo y metacrilato de metilo y soluble tanto en el líquido gástrico como en una solución débilmente ácida (se disuelve a $\text{pH} \leq 5$) [Thakral, 2013].

A día de hoy, estos polímeros se han empleado ampliamente en la industria o investigación farmacéutica para el desarrollo y liberación controlada de fármacos, y más escasamente en el desarrollo de biosensores. Algunas de las aplicaciones más atractivas en este campo se discuten brevemente a continuación. Así, por ejemplo, el polímero Eudragit L100, debido a la presencia de grupos carboxílicos en su estructura, se ha empleado para la inmovilización covalente de anticuerpos en el desarrollo de biosensores ópticos. Estas estrategias están basadas en la formación de microesferas del polímero L100, mediante su dispersión en etanol y posterior evaporación del disolvente [Giannetti, 2012]; o para el recubrimiento de fibras ópticas [Chiavaioli, 2014], [Chiavaioli, 2015], activándose posteriormente los grupos carboxílicos con la mezcla EDC/NHS, para la inmovilización de anticuerpos específicos a Igs de ratón [Giannetti, 2012], [Chiavaioli, 2015] o PSA [Chiavaioli, 2014], llevándose a cabo posteriormente la transducción óptica de la interacción antígeno-anticuerpo. Cortina y col., desarrollaron una plataforma impedimétrica basada en el empleo del polímero Eudragit S100, para la determinación de urea, monitorizando por EIS la degradación de dicho polímero catalizada por la enzima ureasa. La enzima ureasa se inmoviliza sobre los grupos carboxílicos de la superficie del recubrimiento polimérico y el incremento localizado de pH que se produce tras su interacción con urea favorece la disolución del recubrimiento [Cortina, 2006]. Cabe destacar el aprovechamiento de las características específicas del polímero Eudragit NE 30D, como su permeabilidad y la posibilidad de hidratación, en el desarrollo de biosensores enzimáticos para la determinación amperométrica de lactosa, empleando dicho polímero para el atrapamiento de las enzimas β -galactosidasa y glucosa oxidasa (GOx) [Loechel, 1998].

2.4. Interés y métodos para determinar alérgenos y fraudes alimentarios

Actualmente, una de las principales prioridades de las autoridades y de los profesionales de la industria agroalimentaria es garantizar la seguridad alimentaria. La evolución y los nuevos retos que afronta nuestra sociedad, fijan el foco de atención en algunos problemas de seguridad alimentaria emergentes, como los trastornos alimentarios debidos a alergias o intolerancias, a la identificación de especies para la autenticación de productos alimentarios o al control de organismos modificados genéticamente. Aunque el objetivo principal es proporcionar alimentos seguros para la salud de los consumidores, existen otras razones económicas, religiosas o de convencimiento personal en la defensa de la biodiversidad y cuidado del medio ambiente, que están cobrando cada vez mayor interés en los consumidores, obligando a los gobiernos y a la industria alimentaria a un etiquetado cada vez más riguroso, que ayude a la población a elegir el producto alimentario de interés y a identificar su contenido, permitiéndoles ejercer su libertad de elección, garantizar su propia seguridad alimentaria y recuperar su confianza [\[Martín-Fernández, 2017\]](#), [\[Campuzano, 2016\]](#).

La alergia se considera un problema de gran importancia para la salud pública, extendiéndose a la mayoría de los países. En la actualidad, este tipo de enfermedades afecta al 20 % de la población mundial y se estima que para el año 2025 el 50 % de la población mundial podría sufrirlas. De hecho, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la alergia es una de las seis patologías más comunes en el mundo, y se conoce como "la pandemia del siglo XXI" [\[Campuzano, 2016\]](#), [\[Zubeldia, 2012\]](#).

En concreto, la alergia alimentaria es un tipo de reacción adversa a los alimentos, producida por un mecanismo inmunológico como consecuencia de la ingesta, contacto o inhalación de ciertas sustancias presentes en los alimentos, conocidas como alérgenos. La alergia alimentaria debe diferenciarse de otros trastornos alimentarios que no son mediados por un mecanismo inmune, como es el caso de las intolerancias (ej: mala absorción de carbohidratos como la lactosa), intoxicaciones (ej: toxinas de pescado), efectos farmacológicos (ej: cafeína) o idiopáticos (ej: sulfitos) [\[Lucero, 2012\]](#).

El proceso de sensibilización se divide fundamentalmente en dos etapas, una primera etapa de sensibilización, donde la presencia de dicho alérgeno en el organismo provoca, por primera vez, una reacción alterada del sistema inmune, sin que tenga lugar una manifestación clínica de alergia. Dicho alérgeno es reconocido por linfocitos Th0, que serán diferenciados en linfocitos Th2, y secretan interleucinas que producen el aumento de linfocitos B y la producción masiva de anticuerpos (IgE) específicos del alérgeno. Estos anticuerpos se unen con elevada afinidad a receptores localizados en los mastocitos y en los basófilos, sensibilizando a los organismos contra dicho alérgeno. Tras esta primera etapa, la ingesta de dicho alérgeno generaría el reconocimiento de los anticuerpos presentes en la superficie de los mastocitos y basófilos provocando la liberación de histamina y otras sustancias inflamatorias en la piel, mucosa y sangre, que son las responsables de los síntomas que aparecen en las reacciones alérgicas [Dhanapala, 2015].

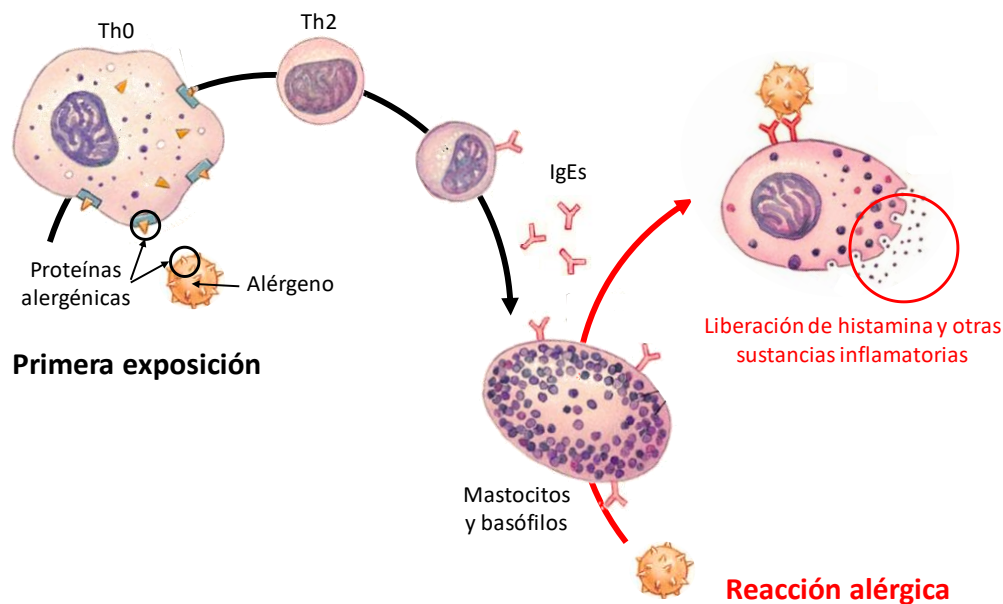


Fig. 2.5: Diagrama esquemático del proceso de sensibilización.

Aunque las proteínas suponen una mínima proporción de la masa total de los alimentos, la mayoría de alérgenos alimentarios son de naturaleza proteica, ya que son capaces de generar una exacerbada respuesta inmunológica. Las manifestaciones clínicas de la alergia alimentaria dependerán del grado de activación inmunológica que origine el alérgeno, estando esta sujeta tanto a las características del paciente como del propio alérgeno, de su procesado y su resistencia a la desnaturalización en nuestro organismo. Pueden desarrollarse síntomas locales (problemas digestivos, vómitos o

dolor abdominal) o sistemáticos (cutáneos, respiratorios o cardiovasculares). Aquellas proteínas alergénicas que poseen elevada resistencia a la desnaturalización penetran mediante el sistema digestivo hasta los intestinos, donde se produce su absorción y provocan respuestas alergénicas más graves, como broncoespasmos, inflamaciones o incluso shocks anafilácticos [Dhanapala, 2015], [Sánchez, 2018]. Sin embargo, es importante aclarar que la manifestación de la sensibilización no depende de la dosis, ya que una ingesta mínima de alérgeno puede desencadenar reacciones alérgicas graves en los pacientes sensibilizados. Por ello, a día de hoy, la única forma eficaz de prevenir este tipo de reacciones es evitar el contacto o consumo de dicho alérgeno o sus derivados [Campuzano, 2016], [Sánchez, 2018].

Por lo general, las normas de etiquetado de productos alimentarios sólo incluían los principales alimentos empleados para su preparación, sin tener en cuenta que durante las etapas de recolección, fabricación, envasado y distribución pueden sufrir contaminación con alérgenos a niveles suficientes para desencadenar una reacción alérgica. El auge de enfermedades de sensibilización ha promovido en la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda o Japón, la imposición de indicar en el etiquetado la presencia de los principales alérgenos alimentarios, independientemente de su concentración, puesto que no existe consenso sobre el valor umbral para el etiquetado de alérgenos [Martín-Fernández, 2017].

De manera general, la alergia alimentaria afecta a alrededor del 80 % de la población infantil y al 5 % de la población adulta. Esto puede explicarse por los mecanismos de regulación y tolerancia inmunológica asociados al desarrollo y maduración del sistema inmune [Flanagan, 2015], [Sathe, 2016], [Sánchez, 2018]. Los principales alimentos que causan reacciones alergénicas en la población infantil son la leche de vaca y el huevo, y en menor medida el cacahuete, trigo, soja, otros frutos secos, pescado o mariscos. Afortunadamente, a medida que los niños crecen, se desarrolla tolerancia a estos alimentos (leche y huevo), reduciendo su incidencia en la población adulta, pero en su lugar prevalecen o incluso aparecen alergias a otros alimentos como el cacahuete, avellana, mariscos y frutas [Sicherer, 2006], [Zubeldia, 2012]. Es por ello que en esta Tesis Doctoral se han seleccionado como alérgenos diana para el desarrollo de bioplataformas electroquímicas los que afectan mayoritariamente a la población infantil, presentes en la leche de vaca y huevo, y aquellos que generan las reacciones alérgicas más severas, como el cacahuete y avellana.

Por otro lado, el fraude alimentario es una de las prácticas más antiguas utilizadas para la obtención de beneficios, mediante la adición de sustancias no declaradas a productos alimentarios, reduciendo los costes de fabricación y/o producción y abaratando el producto final [Everstine, 2013]. El aumento de este tipo de prácticas fraudulentas y su difusión está directamente relacionado con la globalización y difusión rápida de información, pudiendo llegar a generar un elevado impacto en la población mundial y contribuyendo significativamente a la falta de confianza del consumidor [Ellis, 2015]. Este tipo de prácticas engañosas son consideradas por la legislación española como un acto ilegal sancionado económica y penalmente. Por otro lado, y aunque no es lo habitual, también podrían suponer un peligro para la salud de la población sensibilizada frente a distintos alérgenos. Además, es el consumidor quien debe elegir, en función de su estilo de vida, costumbres o creencias, qué es lo que consume [Johnson, 2014].

Uno de los tipos de fraude alimentario que involucra alrededor del 3 % del total de infracciones alimentarias son las adulteraciones, entendidas como la adición de ingredientes extraños, inadecuados o de mala calidad a un producto alimenticio [Premanandh, 2013]. Hoy en día, los consumidores europeos exigen cada vez una mayor información sobre el origen y contenido de los productos que consumen. Sin embargo, sigue siendo un reto importante y difícil, tanto para la industria alimentaria como para las instituciones, el buen etiquetado y la identificación de adulteraciones, sobre todo las que implican la diferenciación entre especies animales o vegetales, debido a la elevada homología y similitud de características organolépticas. Habitualmente estas prácticas fraudulentas se basan en la sustitución parcial o total del alimento original mediante la adición de aditivos para enmascarar la falta de calidad de la materia prima y/o sustitución con alimentos de menor coste [Campuzano, 2016]. Es por ello que los alimentos o ingredientes de elevado valor o mayor consumo, como café, leche, té, pescado, miel, cereales, vino, especias o muestras cárnicas, son los más vulnerables de sufrir adulteraciones [Johnson, 2014]. Los productos lácteos y cárnicos, que se encuentran entre los 25 alimentos más comúnmente adulterados [Campuzano, 2016], son las dianas seleccionadas para su determinación en esta Tesis Doctoral.

2.4.1. Alérgenos y fraudes alimentarios en muestras de leche

La leche es una secreción nutritiva producida por las células secretoras de las glándulas mamarias de los mamíferos. Su principal función es nutrir a los recién nacidos durante las primeras etapas de maduración, además de proteger el tracto gastrointestinal y regular los procesos de obtención de energía. Su composición depende de distintos factores (genéticos, ciclos de reproducción, alimentación y condiciones climáticas) y consiste esencialmente en una mezcla de lactosa, lípidos, proteínas y aminoácidos, entre otros. [Kamizake, 2013]. Aunque la leche de los mamíferos está constituida principalmente por los mismos componentes esenciales (agua, proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales) existen algunas diferencias, siendo mayores entre la leche de rumiantes y no rumiantes. Debido a la influencia de factores genéticos, fisiológicos, nutricionales y ambientales, pueden existir diferencias tanto en la composición como en las propiedades organolépticas dentro de una misma o distintas especies. La leche de vaca es sin duda el tipo de leche más consumida, dominando la producción mundial y representado el 85 % de la leche generada en todo el mundo, seguida de la leche de búfala, cabra, oveja y camella [Claeys, 2014].

La introducción de la leche de vaca en la dieta humana se remonta a hace 9000 años. La domesticación del ganado proporcionó componentes importantes en nuestra dieta, como la leche y la carne, pero también dio lugar a la aparición de reacciones adversas [Hochwallner, 2014], describiéndose los primeros indicios de sensibilización a la leche de vaca por Hipócrates en el 370 a.C. Sin embargo, no es hasta principios del siglo XX cuando se tiene conciencia sobre problemas de alergia alimentaria asociados al consumo de leche de vaca o sus derivados [Hochwallner, 2014]. Hoy en día, la leche de vaca es uno de los primeros alimentos introducidos al final de la lactancia materna en nuestra dieta, y por lo tanto, es una de las principales causas de alergia alimentaria durante la infancia. Aproximadamente el 3 % de los bebés y niños pequeños sufren sensibilización a la leche de vaca durante sus primeros años de vida. Los síntomas más comunes provocados por esta alergia son problemas cutáneos como eccemas atópicos, o gastrointestinales como vómitos y diarrea, aunque pueden llegar a producir complicaciones respiratorias e incluso shock anafiláctico. Alrededor del 85 % de los niños alérgicos a la leche la superan a la edad de tres años, aunque en los casos más

graves puede persistir hasta la edad adulta [Luis, 2009]. Es por ello que la leche se considera uno de los principales alérgenos alimentarios, y debe declararse su presencia incluso a niveles de traza en cualquier etiquetado [Monaci, 2011].

Los alérgenos más importantes que se encuentran en la fracción del suero de la leche son: α -lactoalbúmina (α -LA), β -lactoglobulina (β -LG), Igs, albúmina de suero bovino (BSA) y lactoferrina. No obstante, existe una gran variabilidad tanto en las respuestas inmunológicas como en la sintomatología que se manifiesta en la alergia a la leche de vaca, produciéndose en el 75 % de los pacientes una sensibilización contra varias proteínas de la leche, siendo las caseínas, la α -LA y la β -LG las proteínas alergénicas más comunes de la leche [Claeys, 2014], [Hochwallner, 2014].

β -lactoglobulina (β -LG):

La β -LG es la principal proteína sérica alergénica de la leche de los rumiantes. Aunque no está presente en la leche humana, su presencia en la leche de vaca no resulta problemática puesto que proporciona un elevado aporte nutritivo. Sin embargo, los problemas de sensibilización que puede ocasionar limitan su empleo en la producción de fórmulas infantiles. La β -LG es un monómero de 18 kDa formado por 162 aminoácidos, que contiene cinco residuos de cisteína, cuatro de los cuales tienen puentes disulfuro y cuya escisión aumenta la susceptibilidad a la proteólisis. En condiciones fisiológicas, esta proteína existe normalmente en forma de dímero [Negroni, 1998], [Ren, 2010], [Kehoe, 2014], [Mehraban, 2013]. La estructura secundaria incluye estructuras en α -hélice (15 %), lámina β (50 %) y forma invertida (15–20 %). Debido a estas estructuras secundarias, se producen interacciones intramoleculares formando puentes disulfuro, dirigiendo las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas hacia el interior y exterior, respectivamente [Ledesma, 2002]. Pertenece a la familia de proteínas transportadoras gracias a la presencia de ocho láminas β antiparalelas en su estructura, presentando una elevada afinidad por la unión específica de ligandos hidrofóbicos como los retinoides, esteroides, ácidos grasos, vitaminas y colesterol [Mehraban, 2013]. La β -LG presenta una baja estabilidad frente a agentes desnaturizantes, como calor, álcalis, compuestos orgánicos y metales pesados. El aumento de temperatura provoca la disociación del dímero y por lo tanto la exposición de los grupos sulfhídricos y la formación de agregados [Ledesma, 2002]. En el intervalo de pH del estómago (1.5–5), se disocia reversiblemente en sus monómeros, mientras que su estructura nativa permanece intacta, presentando esta una elevada resistencia a la

degradación por la pepsina en el estómago. Debido a estas propiedades excepcionales, es posible detectar la presencia de β -LG intacta en el intestino delgado, donde se produce la mayor parte de su digestión [Mehraban, 2013].

α -lactoalbúmina (α -LA):

La α -LA también es una de las proteínas alergénicas de la leche y representa el 25 % de las proteínas séricas. Tiene un peso molecular de 14 kDa, está constituida por 123 aminoácidos y estabilizada por cuatro enlaces disulfuro [Ledesma, 2002]. La α -LA pertenece a la familia de proteínas fijadoras de calcio, sin embargo, difiere de estas por presentar una estructura más compacta y por la presencia de tan sólo 10 aminoácidos en el dominio dispuesto en forma de bucle, responsable de la fijación de Ca^{2+} . Otros dos dominios: un dominio α -hélice en N-terminal y un dominio de β -lámina en C-terminal, flanquean el bucle de unión a Ca^{2+} . A ambos lados del bucle hay residuos de cisteína que forman los cuatro enlaces disulfuro y estabilizan la estructura. Su función biológica consiste en regular el sistema galactosiltransferasa, que sintetiza lactosa y puede interactuar con las membranas lipídicas, ácido esteárico o ácido palmítico; los principales epítomos de unión a IgE están localizados en los extremos N- y C-terminales de esta proteína [Hochwallner, 2014].

La α -LA está presente en la leche de todos los mamíferos. Es la proteína más abundante en el suero lácteo humano ($\sim 2.44 \text{ g L}^{-1}$) y la segunda más abundante en el suero bovino ($\sim 0.8\text{--}1.2 \text{ g L}^{-1}$). Sin embargo, el grado de homología entre las secuencias proteicas de α -LA humana y bovina es tan sólo de un 74 %, por lo que no se consideran homólogas. Se considera una proteína de elevado valor nutricional para los recién nacidos y fuente principal de aminoácidos esenciales (cisteína y triptófano), por lo que se emplea para mejorar el aporte nutritivo en fórmulas infantiles o en leche de vaca con objeto de aproximar su composición a la de la leche materna. Además, se ha descrito que la α -LA también puede tener actividad fisiológica a través del control de la microbiota intestinal, la función inmunológica y la absorción de minerales [Indyk, 2009].

En comparación con otras proteínas de la leche, es relativamente estable cuando se encuentra ligada a Ca^{2+} , y muestra una configuración estable a valores de pH comprendidos entre 5.4 y 9 [Indyk, 2009], [Ledesma, 2002]. Está descrito que la eliminación de este catión del medio conduce a un cambio conformacional en la

estructura de α -LA, que conlleva la disminución de su estabilidad por aumento de la temperatura o presencia de agentes químicos. Sin embargo, en comparación con la β -LG, presenta una mayor resistencia a los cambios de temperatura [Hernández, 2002].

Como se ha comentado anteriormente, los productos lácteos son una parte muy importante de la dieta debido a su alto valor nutritivo. Por este motivo, y debido a su elevado consumo, tienen una gran importancia económica en la industria alimentaria y son uno de los alimentos más susceptibles de ser adulterados [Harley, 2006], [Afzal, 2011], por lo que es uno de los principales problemas a los que tiene que hacer frente la seguridad alimentaria actual.

La leche puede adulterarse por adición de agua, neutralizadores, sal, azúcar, proteínas o productos lácteos de diferente origen animal. La adulteración de la leche con leche de otras especies o con calostro de la misma o de diferente especie animal se considera actualmente un problema de gran interés, siendo necesaria su detección por cuestiones legales, religiosas, éticas, culturales o de salud. Según el Reglamento (CE) n° 273/2008 de la Comunidad Europea (Reglamento (CE) n° 273/2008 de la Comisión), la presencia de leche de otras especies a concentraciones superiores al 1.0 % (v/v) se considera adulteración. A pesar de su importancia, la detección de este tipo de adulteraciones resulta compleja debido a la similitud en la composición de las leches procedentes de distinto origen animal. [Hurley, 2004], [Abdelfatah, 2015], [Harley, 2006], [Galán-Malo 2018], [Borková, 2005]. La prevalencia en la producción de leche de vaca en el mundo hace que sea uno de los productos alimenticios más económicos, convirtiéndola en la leche utilizada más frecuentemente para la adulteración de leche de otras especies (como oveja, cabra y búfala), empleadas también en la industria alimentaria, pero con producción más reducida o marcadamente estacional, lo que da lugar a déficits en algunos periodos del año, que incrementan su precio [Hurley, 2006], [Colak, 2016].

Por otro lado, la adición intencionada de calostro a la leche también se considera una práctica ilegal, que además de alterar las propiedades organolépticas de los productos lácteos, puede llegar a causar problemas tecnológicos [Conesa, 2005], [Levieux, 2002]. El calostro es la leche secretada durante los primeros días después del parto. El calostro presenta niveles de proteínas séricas entre 50 y 100 veces superiores (principalmente β -LG, α -LA, Igs, lactoperoxidasa, lactoferrina, transferrina, etc) y niveles inferiores de lactosa y caseína, en comparación con la leche cruda [Conesa,

2005], [Levieux, 2002]. Estas proteínas, a niveles tan elevados, pueden precipitar durante los tratamientos térmicos en el procesado de la leche, haciéndolos menos eficaces. Además, existen evidencias en la literatura que confirman que la adición de un 20 % de calostro de vaca o de sólo un 5 % de calostro de cabra causan problemas tecnológicos [Conesa, 2005], [Levieux, 2002], [Galán-Malo, 2014]. Su presencia disminuye la eficiencia en la fabricación de quesos, debido a los bajos niveles de caseína y a la elevada presencia de lactoferrina y lactoperoxidasa (con propiedades antimicrobianas), que afectan negativamente al crecimiento bacteriano, responsable de la fermentación y maduración del queso [Galán-Malo, 2014], [Conesa, 2005]. Pese a todo, actualmente no existe una legislación que contemple los niveles de calostro aceptados en la leche.

Inmunoglobulinas G (IgG) como biomarcadores de adulteración:

Las inmunoglobulinas (Igs), componentes esenciales en la actividad inmunológica del calostro y la leche, son secretadas por las células epiteliales mamarias y transferidas fuera de la glándula mamaria por eyección de leche. En la leche de rumiantes existen tres clases de Igs: IgG, IgA e IgM. Entre ellas, la IgG representa el 80 % de las Igs totales, siendo la IgG1 la subclase predominante [Korhonen, 2000], [Gapper, 2007], [Conesa, 2005], [Hurley, 2011], [Galán-Malo, 2014]. La especificidad de las IgGs entre diferentes especies animales y los altos niveles encontrados en leche cruda y calostro, hacen de las IgGs un biomarcador excelente para discriminar el origen animal y el mejor indicador de la presencia de calostro en leche, debido a la elevada relación de IgGs en calostro/leche [Conesa, 2005], [Galán-Malo, 2014]. Además, las IgGs no son fácilmente susceptibles a la proteólisis y son mejores inmunógenos que las caseínas y otras proteínas del suero, características que las convierten en dianas muy interesantes para detectar la adulteración de especies en productos lácteos [Borková, 2005], [Harley, 2006].

2.4.2. Alérgenos en frutos secos

En los últimos años se está produciendo un aumento considerable en el consumo de frutos secos debido a sus efectos beneficiosos para la salud, como la regulación de enfermedades coronarias y de los niveles séricos de colesterol. Sin embargo, los frutos secos se encuentran entre los mayores responsables de reacciones alérgicas, destacando

que su sensibilización, a diferencia que la de otros alimentos alergénicos como la leche, el huevo, la soja y el trigo, rara vez se supera. Especialmente en Estados Unidos, la alergia al cacahuete ha surgido como un problema de salud pública emergente. Las reacciones alérgicas producidas por el resto de frutos secos suelen ser menos frecuentes, aunque al igual que el cacahuete, desencadenan reacciones alérgicas graves o incluso mortales en algunos casos. Está descrito que el cacahuete y el resto de frutos secos son los responsables del 63 y 31 %, respectivamente, de las muertes causadas por alergia alimentaria en Estados Unidos en el siglo XX, considerándose los responsables del 100 % de las muertes causadas por shock anafiláctico en la población mayor de 6 años. Es importante destacar, que tanto el aumento de su consumo directo como su creciente empleo en productos alimentarios procesados como la leche, barritas multicereales, chocolates, bollería, etc., facilita la contaminación no intencionada en la cadena de producción de otros productos alimenticios [Crespo, 2006], [Sicherer, 1998].

Hasta la fecha, se ha descrito la presencia de alérgenos en anacardos, avellanas, cacahuetes, castañas y nueces. La mayoría de los alérgenos presentes en los frutos secos son proteínas de almacenamiento de semillas, como las vicilinas (globulinas 7S), las leguminosas (globulinas 11-13S) y las albúminas (2S), aunque existen otras como las profilinas, consideradas las principales responsables de la amplia reactividad inmunológica cruzada entre los alérgenos transmitidos por aire y en los alimentos, o las proteínas transportadoras de lípidos (LTPs), que están muy extendidas en el reino vegetal [Crespo, 2006].

La incidencia y gravedad de los síntomas asociados a la alergia al cacahuete [Sheikh, 2013] ha promovido la selección de este fruto seco como diana en esta Tesis Doctoral.

La alergia al cacahuete afecta alrededor del 1 % de la población mundial, persistiendo en el 80 % de los pacientes sensibilizados [Peng, 2013]. El cacahuete (*Arachis hypogaea*) es una legumbre perteneciente a la familia de las papilionáceas de la orden de los Fabales, como las lentejas, garbanzos, guisantes, frijoles y soja. El consumo de cacahuete está ampliamente establecido, bien como alimento individual o como ingrediente en diversos productos, aprovechándose en la industria alimentaria tanto el propio fruto, su harina, la cáscara o incluso la parra [Zhao, 2012]. Sin embargo, la ingesta de este fruto seco o sus derivados no es la única vía de exposición a sus principales proteínas alergénicas, ya que la elevada estabilidad de estas hace posible que

situaciones tan cotidianas como compartir utensilios de cocina o un simple beso, puedan desencadenar reacciones alérgicas graves, lo que hace muy importante llevar un control cada vez más estricto, en los comedores escolares o en nuestras familias, para proteger debidamente a las personas sensibilizadas [Maloney, 2006].

A día de hoy, se ha descrito un amplio espectro de manifestaciones clínicas a este fruto seco, desde problemas cutáneos hasta reacciones sistémicas, cardiovasculares, gastrointestinales y/o respiratorias. Estos síntomas pueden llegar a presentarse en cuestión de minutos tras la ingesta de cantidades mínimas de cacahuete [Al-Ahmed, 2008]. Aunque en la mayoría de la población sensibilizada los síntomas se desarrollan después de ingerir al menos un cacahuete, que contiene alrededor de 200 mg de proteínas, se han desencadenado reacciones alérgicas para dosis tan bajas como 100 µg en pacientes altamente sensibilizados. No obstante, una sintomatología evidente se presenta tras ingerir al menos 2 mg de proteínas [Hourihane, 1995], [Taylor, 2002].

Hasta el momento, se han descrito 13 alérgenos del cacahuete (Ara h 1–Ara h 13). Entre ellos, Ara h 1–Ara h 8 se consideran actualmente los alérgenos más importantes del cacahuete [Zhou, 2013]. La sensibilización a una única proteína alergénica del cacahuete es relativamente rara y existen pocos casos descritos de elevada gravedad, por ejemplo, contra Ara h 2, desarrollándose habitualmente una polisensibilización. Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3 se consideran los principales alérgenos del cacahuete, representando aproximadamente el 40 % de su contenido proteico total. La co-sensibilización a estas tres proteínas conlleva, desgraciadamente, a las reacciones alérgicas más graves [Bublin, 2013]. Ara h 1 es la principal responsable de sensibilización, afectando al 95 % de los pacientes con alergia al cacahuete, y Ara h 2 y Ara h 6 se consideran, desde el punto de vista clínico, los mejores predictores de una respuesta alérgica severa [Kukkonen, 2015], [Liu, 2010]. De todas las proteínas alergénicas del cacahuete, para esta Tesis Doctoral se han seleccionado como principales biomarcadores de sensibilización las proteínas Ara h 1 y Ara h 2, dado que el 65 y 71 % de los alérgicos al cacahuete contienen IgEs específicas contra estas dos proteínas, respectivamente. A continuación, se describen algunas características específicas de cada una de ellas.

Ara h 1

La glicoproteína Ara h 1 tiene 65 kDa y comprende entre el 12 y 16 % del contenido total de proteínas en los extractos de cacahuete. Pertenece a la familia de proteínas de reserva de semillas, las vicilinas (7S), y sirven como almacén de nitrógeno y aminoácidos durante el desarrollo y crecimiento de las parras del cacahuete [Pomés, 2003], [Cabanos, 2011]. A pH fisiológico se encuentra de forma estable como un trímero, formado por tres monómeros isoestructurales, que contienen 21 epítomos lineales y 14 en la región central de unión a IgE [Zhou, 2013], [Shin, 1998].

Exhibe su punto isoelectrico a pH ácido, presentando una elevada resistencia a las proteasas, temperatura y otros agentes químicos, lo que le hace ser resistente a la degradación durante su procesado y digestión [Maleki, 2000]. Esta elevada resistencia se atribuye fundamentalmente a la estructura en forma de trímero que estabiliza, reduce o previene la degradación de los epítomos de unión a IgEs, sufriendo degradación únicamente por combinación secuencial de tratamientos por ultrasonidos y enzimáticos [Li, 2013]. Todo esto pone de manifiesto el potencial de este alérgeno como biomarcador proteico para la detección de la presencia de cacahuete en alimentos, independientemente del procesado que haya sufrido [Pomés, 2003].

Ara h 2

La proteína de almacenamiento Ara h 2 también se denomina conglutina. Es una albúmina (2S) de 17.5 kDa y punto isoelectrico a pH 5.2. Representa, aproximadamente, entre el 5.9–9.3 % del contenido total de las proteínas del cacahuete [Zhou, 2013]. Su estructura está formada por cinco α -hélices, que se mantienen unidas y estabilizadas por cuatro enlaces disulfuro, que dan lugar a una súper-hélice con rotación en el sentido de las agujas del reloj y relacionada con la familia de las prolaminas [Mueller, 2011]. Esta estructura dota a esta proteína con propiedades inhibitoras para amilasa y tripsina, y por lo tanto, de gran resistencia a la digestión, que además aumenta ~3.6 veces tras el tostado habitual que se aplica a los frutos secos [Maleki, 2000]. Debido a su resistencia, la digestión en nuestro organismo resulta en un número de péptidos relativamente grandes, altamente resistentes a la degradación enzimática y que conservan prácticamente intactos la mayoría de los epítomos inmunodominantes de unión a IgEs, lo que explica su elevado potencial alergénico y estabilidad a los procesados alimentarios y/o digestión [Lehmann, 2006].

Como ya se ha indicado anteriormente, otro de los frutos secos seleccionados en esta Tesis Doctoral, con una incidencia global del 7.2 %, son las avellanas. Son uno de los frutos secos más consumidos en todo el mundo, y pueden desencadenar desde reacciones alérgicas locales y leves hasta sistémicas y graves, con una prevalencia alrededor del 0.2 y 4.5 % en la población infantil y adulta, respectivamente [Masthoff, 2013-a]. Los síntomas más comunes de las reacciones alérgicas causadas por la avellana incluyen afecciones gastrointestinales, reacciones cutáneas o respiratorias y en ocasiones también shock anafiláctico [Poms, 2004], [Flinterman, 2008], por lo que también está considerado por la Organización Mundial para la Salud (OMS) y la Comisión Europea uno de los alérgenos más peligrosos presentes en los alimentos, incluido en la lista de los 14 alimentos potencialmente alérgicos [Directiva 2007/68/CE].

Hasta ahora, los principales alérgenos descritos en la avellana son las proteínas: Cor a 1 (18 kDa), Cor a 2 (14 kDa), Cor a 12 (17 kDa), Cor a 13 (1416 kDa) y Cor a 9 (40 kDa) [Hirschwehr, 1992], [Mittag, 2004], [D'Andrea, 2011], siendo la Cor a 9 el alérgeno predominante en la población infantil y la Cor a 11 en los adultos [Nitride, 2013].

Cor a 9

La Cor a 9 es una de las principales proteínas alérgicas de la avellana, debido a que el 86 % de la población con alergia a la avellana está sensibilizada a esta proteína. Además, está asociada con las sintomatologías más severas descritas en la población infantil, tanto en Estados Unidos como Europa [Masthoff, 2013-a]. La Cor a 9, también conocida como corilina, pertenece a la familia de las proteínas de reserva de semillas similares a la leguminosa 11S. Se expresa como conjunto de 515 aminoácidos con una masa molecular teórica de 59 kDa. Sin embargo, las proteínas 11S se procesan posteriormente en más de un péptido. Aunque no se han definido los epítomos de unión a IgEs para esta proteína alérgica, sí se ha descrito que presenta un 67 % de homología con uno de los epítomos lineales de unión a IgE de la Ara h 3. No obstante, a día de hoy, se requiere una caracterización exhaustiva tanto de la estructura como de los epítomos de unión a IgEs de las principales proteínas alérgicas de los frutos secos. [Guo, 2009]. De forma general, las leguminosas 11S, después del procesamiento post-traducciona, están formadas por seis pares de subunidades que interactúan de manera no covalente, pudiendo formar estructuras triméricas y hexaméricas [Alessandri, 2012].

La similitud de las reacciones alérgicas severas producidas por la mayoría de frutos secos sugiere la reactividad cruzada entre las proteínas de reserva de semillas (principalmente globulinas y albúminas). A día de hoy, se ha demostrado que los pacientes con sensibilizaciones severas al cacahuete suelen estar sensibilizados también frente a otros frutos secos como la almendra, la nuez y la avellana. También se ha descrito que, por similitud estructural, Cor a 9 presenta reactividad cruzada con Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3, sin embargo, estos resultados no pueden extrapolarse a la posible reactividad cruzada de los epítomos específicos a IgEs [Masthoff, 2013-b].

2.4.3. Alérgenos en huevo

Al igual que la leche, la alergia al huevo afecta fundamentalmente a la población infantil, en concreto al 0.5–2.5 % de niños con edades comprendidas entre los 12 meses y los 3 años de edad. Aunque ~2/3 de ellos consiguen superar la enfermedad en sus primeros 5 años de vida, existe una prevalencia del 0.2–2 % en la población adulta, edad en la que habitualmente se incrementa la severidad de las respuestas alérgicas [Zubeldia, 2012], [Caubet, 2011], [Tey, 2009], [Benedé, 2015], [Jarvinen, 2007]. Los síntomas más comunes descritos para este tipo de alergia incluyen problemas cutáneos, gastrointestinales y respiratorios, que pueden desencadenar en urticaria leve, vómitos, dolor abdominal o incluso anafilaxia [Zubeldia, 2012], [Martorell, 2013].

Los huevos están compuestos fundamentalmente por proteínas y nutrientes, necesarios para el crecimiento y mantenimiento de los tejidos. Aunque hoy en día se consumen huevos de una gran variedad de aves, la mayor incidencia, en términos de alergia, se ha descrito para los huevos de gallina [Belitz, 2009]. Gracias a sus propiedades aglutinantes y coagulantes, resultan de gran interés culinario [Zubeldia, 2012] y forman parte de una amplia variedad de productos manufacturados [Tey, 2009], hechos que hacen particularmente complejo evitar su consumo por parte de la población sensibilizada [Chokshi, 2015]. Los componentes principales del huevo son la clara y la yema, ambos formados principalmente por proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales [Belitz, 2009], siendo las proteínas (Gal d) las responsables de la generación de la respuesta alérgica [Martorell, 2013]. A pesar de que tanto la clara como la yema pueden provocar reacciones alérgicas, se ha descrito que la mayoría de pacientes con alergia al huevo están sensibilizados contra proteínas de la clara [Chokshi, 2015]. En la

clara del huevo se han descrito alrededor de 24 proteínas alergénicas diferentes, considerándose de mayor importancia el ovomucoide (OM) (Gal d 1, 11 %), la ovoalbúmina (Gal d 2, 54 %), la ovotransferrina (Gal d 3, 12 %) y la lisozima (Gal d 4, 3.4 %) [De Silva, 2016], [Bernhisel-Broadbent, 1994]. En cuanto a la yema, hasta el momento sólo se han descrito como proteínas alergénicas la α -livetina (o albúmina de suero de pollo o Gal d 5) y la YPG42 (Gal d 6) [Amo, 2012]. En este punto, cabe destacar que, aunque la ovoalbúmina es la proteína más abundante del huevo, la mayoría de pacientes que sufren esta enfermedad están sensibilizados frente a ella y al OM [Caubet, 2011], [Jarvinen, 2007]. Por ello se seleccionó el OM como biomarcador para la detección de alergia al huevo.

Ovomucoide (OM)

El OM (Gal d 1) comprende el 11 % del contenido proteico total de la clara de huevo [Bernhisel-Broadbent, 1994], [Cooke, 1997]. Es una glicoproteína de 28 kDa compuesta por 186 aminoácidos distribuidos en tres dominios, con un elevado número de estructuras secundarias, como α -hélices (26 %), láminas β (46 %) y giros β (10 %) [Tey, 2009], [Juliá, 2007]. Contiene un total de 9 enlaces disulfuro, de modo que cada dominio está enlazado por tres enlaces disulfuro intradominio, lo que confiere a esta proteína una elevada estabilidad a la temperatura y a la proteólisis [Belitz, 2009], [Juliá, 2007], y hace que se mantenga su potencial alergénico después de someterla a tratamientos térmicos prolongados [Tey, 2009], [Chokshi, 2015]. No obstante, en algunos casos se ha descrito la desnaturalización de las principales proteínas alergénicas del huevo y de sus epítomos de unión contra IgEs después de tratamientos térmicos [Tey, 2009]. Es por ello, que entre el 65–80 % de los niños alérgicos al huevo pueden consumirlos tras ser calentados o cocinados, sin sufrir respuestas alergénicas de importancia, hecho que no se produce si los pacientes están sensibilizados principalmente frente a OM [Chokshi, 2015].

La elevada resistencia del OM a la degradación térmica, digestión enzimática, desnaturalización por urea y resistencia a proteasas [Leduc, 1999], [Matsuda, 1982] dota a esta proteína de un elevado potencial alergénico, incluso en alimentos procesados [Bartnikas, 2013]. Es importante destacar que, en una evaluación cinética de la digestión de OM en fluido gástrico simulado, el 21 % de los pacientes examinados retuvieron su capacidad de unión de IgEs a uno de los fragmentos de OM formado de 4.5 kDa, indicándose que, en este caso, tienen pocas probabilidades de superar su

alergia [Takagi, 2005]. El hecho de que esta enfermedad afecte mayormente a la población infantil (≤ 5 años), se debe fundamentalmente a la falta de madurez del sistema digestivo, en concreto a la secreción de bajos niveles de pepsina y a valores de pHs superiores al óptimo para la digestión enzimática. De hecho, se ha descrito que el OM presente en la clara de huevo cruda o en productos procesados es difícilmente digerible a un pH superior a 3.0. Todo ello justifica el potencial alergénico del huevo en la población infantil y su tolerancia en la edad adulta [Yoshino, 2004].

2.4.4. Adulteraciones en muestras cárnicas

Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral consistió en la detección de adulteraciones en muestras cárnicas, que representan alrededor del 7 % del total de prácticas alimentarias fraudulentas [Johnson, 2014]. Debido al escándalo ocurrido recientemente en Gran Bretaña e Irlanda en 2013, donde se adulteraron lotes de carne de vacuno con carne de caballo [Falkheimer, 2015], [Le Vallée, 2015], y que se extendió por toda Europa, implicando a gran parte del sector alimentario y provocando un elevado impacto en la población europea, se ha seleccionado la adulteración con carne de caballo. Debe mencionarse, además, que la Organización de Consumidores y Usuarios (OCU) presentó un estudio que confirmaba la presencia de carne equina en diferentes productos, como la lasaña Findus comercializada en Europa, o las hamburguesas vendidas en algunos supermercados españoles [Stanciu, 2015].

Aunque según la Comisión Europea, el incidente de la presencia fraudulenta de carne de caballo no afecta a la seguridad de los alimentos ni a la salud pública, el sector alimentario europeo se enfrenta a una crisis de confianza por parte del consumidor, a la reducción del consumo de carne roja y al boicot de productos cárnicos mediante la selección de otros productos o dietas vegetarianas. Además, estos escándalos han resultado temas sociales virales para los medios de comunicación, dando lugar a diferentes opiniones en cuanto al enfoque técnico y al acceso a la información científica. Todo esto ha llevado a la Comisión Europea a lanzar nuevos programas para la prevención del fraude en el sector alimentario y a implementar un sistema comunitario para su autenticación y control, aumentando las exigencias en el etiquetado. Esto se materializó en 2014 mediante la creación de un sistema especializado para el fraude fronterizo y el aumento de capacidades de los funcionarios para su control, además de

una revisión del marco jurídico para asegurar su aplicación [Stanciu, 2013], [Stanciu, 2015].

La producción de carne de caballo para consumo humano no está muy extendida en la mayoría de los países del mundo, aunque su consumo en Europa es mayor por su elevado valor nutricional, ya que contiene importantes ácidos grasos poliinsaturados, como el n-3 [Belaunzaran, 2015] y es una valiosa fuente de minerales (principalmente hierro, fósforo, zinc, magnesio y cobre) y aminoácidos, tanto esenciales (lisina, leucina y arginina), como no esenciales (ácido glutámico, aspártico y alanina) [Azuero, 2016]. Aunque en siglos pasados su empleo en la guerra, caza, agricultura y transporte estuvo muy extendido, en la actualidad estos animales se emplean básicamente para actividades de ocio y medicina. El inicio del consumo de carne de caballo se remonta al Paleolítico tardío, aunque su mayor auge de consumo coincide con la epidemia de encefalitis espongiforme que sufrió el ganado bovino. Antiguamente, la gran mayoría de costumbres religiosas prohibían su consumo, siendo introducido en la dieta sólo en situaciones de necesidad como en periodos de guerras, pobreza y hambruna. Durante la Revolución Francesa se promocionó su consumo por médicos y veterinarios franceses, lo que llevó a su inclusión en la dieta, siendo a día de hoy, junto con Asia, los principales consumidores. Sin embargo, el consumo de carne de caballo no está muy extendido en la población anglosajona, lo que justifica el escándalo originado tras la detección de los primeros casos de productos adulterados con carne de caballo en esta región [Stanciu, 2015]. Las características nutritivas de este tipo de carne la hacen especialmente interesante para su introducción en la mayoría de las dietas. Su producción está aumentando en Europa Occidental, sin embargo, su consumo actual sólo supone un 0.25 % de la producción mundial, muy por debajo de otros productos cárnicos procedentes de ternera, pollo o cerdo [Belaunzaran, 2015]. Todo ello ha provocado un excedente de esta materia prima, y por tanto, su incorporación irregular en otras matrices cárnicas con el fin de abaratar su precio o incrementar su calidad, en cuanto a valor energético [Falkheimer, 2015].

Aunque la presencia de carne equina en otros productos alimentarios no suele representar un riesgo para el consumidor, salvo por la existencia de trastornos alimentarios específicos a este animal o a las proteínas o metabolitos que contiene, es el consumidor quien debe elegir, en función de su estilo de vida, costumbres o creencias, qué es lo que consume, por lo que su introducción en alimentos, a un nivel igual o

superior al 1.0 % se considera adulteración y debe incluirse en las especificaciones del producto [Johnson, 2014], [Campuzano, 2016], [Falkheimer, 2015].

En la actualidad, está ampliamente extendido el empleo del ADN como un código de barras específico para la identificación rápida y precisa de especies, sugiriéndose para el estudio, evaluación o identificación de especies animales, las regiones que comprenden el ADN mitocondrial [Valentini, 2009]. Por todo ello, en esta Tesis Doctoral se seleccionó un fragmento específico de la región *D-loop* del ADN mitocondrial de caballo como biomarcador diana para la detección de adulteraciones con carnes de esta especie animal.

ADN mitocondrial como biomarcador de adulteraciones

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula de ADN de doble cadena, circular y de pequeño tamaño (en comparación con el ADN genómico), ubicado en las mitocondrias, fuera del núcleo de las células. La mayoría de células animales contienen cientos de copias de ADNmt, mientras que sólo poseen dos copias de ADN genómico. Los genes presentes en el ADNmt raramente se recombinan y presentan una elevada resistencia a la degradación por su propia estructura y tamaño. Dado que el ADNmt está presente en múltiples copias y que cada célula presenta un elevado número de mitocondrias, su empleo como biomarcador garantiza la disponibilidad suficiente de material genético en las muestras analizadas, independientemente de su posible degradación. El ADNmt de todos los mamíferos contiene 13 genes codificantes de proteínas: subunidades 1, 2 y 3 de la citocromo oxidasa (CO1-CO3), subunidad citocromo b (cytb), subunidades 1, 2, 3, 4, 4L, 5, y 6 de la NADH deshidrogenasa (ND1-ND6, ND4L), subunidades 6 y 8 de la ATPasa (ATP6 y ATP8), 2 genes de ARN ribosómico (12S y 16S) y 22 genes de ARN de transferencia [Luo, 2011]. La diferencia entre los genes mitocondriales inter o intra-especies es mayor de 10, lo que los convierte en biomarcadores eficaces para la diferenciación de especies animales en alimentos [Ali, 2012-a]. En concreto, el fragmento de ADN mitocondrial de caballo seleccionado en esta Tesis Doctoral pertenece a la región *D-loop*, principal región no codificante del ADNmt. Aunque su función en la actualidad no está clara, se considera una región de control dentro del ADNmt.

El ADNmt de caballo presenta una longitud de secuencia de 16660 bp. En concreto, la región *D-loop* ha sido ampliamente estudiada por su elevado grado de

conservación. Esta región presenta una longitud de 968 bp (excluyendo la región de repetición en tándem) y está formada por 17 haplotipos, con un total de 67 sitios polimórficos, de los que el 97 % se deben únicamente a sustituciones de nucleótidos simples. Todo ello demuestra la elevada homología y conservación de esta región para diferentes poblaciones de caballos y su adecuación de empleo para la identificación inequívoca del material genético de cualquier caballo, independientemente de su especie [Yang, 2002].

Aunque hasta la fecha, a excepción de los trabajos frutos de esta Tesis Doctoral, no se han desarrollado plataformas biosensoras para la detección de ADNmt de caballo, este material genético sí se ha empleado para la identificación de otras especies animales, por ejemplo, cerdo en alimentos procesados [Dooley, 2004], [Tanabe, 2007], [Kesmen, 2009]. Además, gracias a las características discutidas del ADNmt, se han desarrollado estrategias atractivas, en ausencia de amplificación del material genético por PCR, para la detección de adulteraciones con carne de cerdo, tanto en alimentos crudos como procesados, a los niveles exigidos por la legislación (1.0 % (p/p)), empleando biosensores ópticos basados en formatos de hibridación tipo sándwich, que implican sondas de detección modificadas con fluoróforos y AuNPs con fines de amplificación [Ali, 2011], [Ali, 2012-a], [Ali, 2012-b].

2.4.5. Determinación de alérgenos y fraudes alimentarios

Garantizar la seguridad alimentaria adquiere cada día mayor importancia tanto para la población como para las instituciones y la industria alimentaria. Ello exige la necesidad de desarrollar metodologías analíticas que permitan el control de productos alimentarios en el punto de atención.

En el desarrollo de metodologías analíticas para seguridad alimentaria, uno de los factores clave reside en la selección del analito diana a determinar. En el caso concreto de los alérgenos alimentarios, la mayoría de respuestas alérgicas se presentan debido a la sensibilización frente a varias proteínas de un mismo alimento, lo que lleva a cuestionar si la identificación de un único biomarcador permite el control fiable de los productos alimentarios y la protección de la población sensibilizada. Todo ello ha conducido a la identificación de múltiples analitos diana, o incluso de biomarcadores de diferente naturaleza, aunque no posean ningún potencial alérgico, pero que permiten

la detección del alimento alergénico con elevada sensibilidad y selectividad, incluso en productos procesados. Otro de los requisitos importantes en el desarrollo de estrategias biosensoras, es la especificidad por el analito diana, sin embargo, tanto en la detección de alérgenos como de marcadores de adulteración, este factor debería evaluarse particularmente para cada aplicación. Puede resultar de interés tanto el desarrollo de estrategias altamente específicas, para evitar reactividad cruzada con otros alimentos o proteínas de estructura similar, permitiendo su identificación inequívoca, como el desarrollo de estrategias que permitan la identificación de una amplia familia, tanto animal como vegetal, con el mismo potencial alergénico, pero que presente ciertas diferencias en sus principales proteínas alergénicas [Hengel, 2007].

Las metodologías más comúnmente empleadas para la determinación cuantitativa o semicuantitativa de los marcadores proteicos o genéticos seleccionados como diana en esta Tesis Doctoral incluyen: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) [Colak, 2016], enfoque isoelectrico [Hurley, 2006], electroforesis capilar [Pelaez-Lorenzo, 2009], cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa [Ren, 2010], cromatografía de intercambio iónico [Borková, 2005], cromatografía de exclusión por tamaño [Gapper, 2007], [Dijk, 2000], cromatografía acoplada a espectrometría de masas, nefelometría [Galán-Malo, 2014], [Cuillière, 1997], métodos basados en la admitancia eléctrica (espectroscopia, conductancia, imagen digital, UV-visible o espectroscopia de infrarrojos) [Santos, 2013], resonancia de plasmones superficiales (SPR) [Hohensinner, 2007], [Billakanti, 2010] y fluorescencia inducida por láser (LIF) [Peláez-Lorenzo, 2009]. Las técnicas basadas en el empleo de anticuerpos para el reconocimiento específico de proteínas incluyen: inmunocromatografía [Colak, 2016], inmunotransferencia, inmunoensayo de flujo lateral [Galán-Malo, 2018], inmunodifusión radial (RID) [Gapper, 2007], [Galán-Malo, 2014], cromatografía de inmutafinidad enzimática (ELIAC) [Puerta, 2005], radio inmunoensayos (RIA) o ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISAs). Además, existen metodologías para la detección de marcadores genéticos basadas principalmente en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [Mayer, 2005] o variantes como PCR en tiempo real (RT-PCR) [Sakalar, 2012], PCR con múltiples cebadores [Bai, 2009], PCR-microarrays, PCR-ELISA, PCR de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) [Abdelfatah, 2015], o amplificaciones isotérmicas mediadas por bucle (LAMP) [Ahmed, 2010].

De entre todas estas técnicas disponibles para la detección de alérgenos y fraudes alimentarios, la metodología ELISA y las técnicas basadas en el empleo de PCR son las empleadas principalmente en el sector agroalimentario, mientras que la aplicación del resto de las metodologías está prácticamente limitada al ámbito de la investigación [Hengel, 2007], [Monaci, 2010], [Kirsch, 2009].

La metodología ELISA es una técnica cuantitativa basada en la monitorización del reconocimiento antígeno-anticuerpo, en la que se emplean anticuerpos conjugados con enzimas (beta-galactosidasa, GOx, HRP y AP) como etiquetas que catalizan una reacción bioquímica y son capaces de generar un producto detectable, como un cambio de color u otras variaciones ópticas, que resultan proporcionales a la concentración del analito de interés en un determinado intervalo. Los formatos de inmunoensayo empleados son homólogos a los descritos en el apartado 2.2.1, a partir de la inmovilización de los bioreactivos de reconocimiento sobre una fase sólida de poliestireno, polivinilo o polipropileno (conocida comúnmente como placa ELISA multipocillo). Su empleo está ampliamente aceptado por su elevada especificidad, simplicidad, sensibilidad, y su sencilla manipulación en ausencia de personal altamente cualificado. Esta tecnología ha sufrido un gran avance en los últimos años, dando lugar al rápido desarrollo de diferentes kits de inmunoensayo comerciales para su uso en la industria agroalimentaria y por parte de las instituciones encargadas del control alimentario [Asensio, 2008], [Hengel, 2007], [Ayudin, 2017]. En los últimos años, también están cobrando especial interés los inmunoensayos de flujo lateral, que emplean los mismos principios de inmunoensayo que las pruebas ELISA, pero inmovilizando los bioreactivos en una membrana de nitrocelulosa, y empleando como etiquetas conjugados de oro coloidal o tintes. Su simplicidad, coste y tiempos de análisis reducidos los hacen muy adecuados para el cribado en la industria alimentaria, aunque la imposibilidad de cuantificación continúa siendo un factor limitante para su empleo [Asensio, 2008].

Por otro lado, el empleo de la metodología ELISA supone ciertas desventajas como son el tiempo de ensayo, la necesidad de realizar numerosas etapas de incubación y lavados y de emplear instrumentación compleja y costosa disponible sólo en entornos centralizados, la incompatibilidad con multiplexado y la posible obtención de falsos positivos como consecuencia de interacciones no específicas o reactividad cruzada con otras especies [Gan, 2013]. En concreto, en la determinación de marcadores proteicos

en productos alimentarios, la gran limitación radica en la modificación y/o desnaturalización de la estructura proteica, y por tanto, de los epítomos que reconocen los anticuerpos empleados. Por estos motivos, en la actualidad, las metodologías de inmunoensayo están dirigidas fundamentalmente al análisis de proteínas altamente resistentes a la temperatura, a la presión y a la digestión por enzimas [Asensio, 2008].

Los métodos convencionales para la detección de marcadores genéticos se basan en la detección de un fragmento de ADN o ARN característico del gen que codifica la proteína alergénica de interés. En este caso, la mayor dificultad radica, esencialmente, en la elección del fragmento genético diana, por la falta de disponibilidad de los genomas vegetales y animales para la alineación y comparación de secuencias entre especies, para flanquear zonas características que proporcionen la discriminación requerida, en el diseño de secuencias complementarias para el desarrollo de estrategias de amplificación por PCR o ensayos de hibridación [Monaci, 2010].

La PCR es una técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por el premio nobel Kary B. Mullis, basada en los procesos naturales de replicación de las células, capaz de amplificar una sola copia o unas pocas copias de ADN en varios órdenes de magnitud, generando de miles a millones de copias de una secuencia particular de ADN. Esta técnica se basa en la aplicación de ciclos de temperatura para la desnaturalización del ADN, la hibridación específica mediante el empleo de cebadores de ADN de pequeña longitud y la elongación de la secuencia de interés por medio de polimerasas termoestables. La PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) permite la monitorización de todo el proceso gracias al empleo de sondas fluorescentes, considerándose el método más preciso para la detección de ácidos nucleicos [Miao, 2015].

Las principales ventajas de su empleo son la elevada sensibilidad y especificidad que ofrece. Además, el ADN presenta mayor resistencia a la degradación por temperatura o presión y puede extraerse con elevada eficiencia incluso en muestras altamente degradadas. Sin embargo, todavía existen problemas significativos con el uso de la PCR para la cuantificación, como la existencia de falsos negativos, los elevados tiempos de análisis y la necesidad de equipos costosos y centralizados. En concreto, para su aplicación en seguridad alimentaria, esta técnica no permite una verdadera valoración del potencial alergénico al no detectar directamente proteínas alergénicas;

teniendo en cuenta, además, que en los productos procesados puede haberse separado la fracción proteica (principal causa de sensibilización) de la genética [Poms, 2004].

A continuación, se discuten los fundamentos, las principales características analíticas y operacionales y la aplicación a muestras reales de: i) plataformas inmunosensoras y genosensoras electroquímicas, ii) los principales kits ELISA comercialmente (seleccionados por emplear los mismos inmunoreactivos que los inmunosensores desarrollados, o por sus características analíticas) disponibles y iv) los métodos oficiales para la determinación de los analitos diana seleccionados en el marco de esta Tesis Doctoral (Tabla 2.3).

β-LG

Para la determinación de β-LG únicamente se ha desarrollado una estrategia inmunosensora electroquímica. Se trata de un inmunosensor voltamperométrico, libre de marcaje, basado en el uso de SPCEs modificados con grafeno, para la inmovilización covalente del anticuerpo de captura mediante “electrografting” y glutaraldehído, empleando DPV y el sistema redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ para la monitorización de la concentración de β-LG [Eissa, 2012]. Este inmunosensor proporciona un LD de 0.85 pg mL^{-1} , en un tiempo de análisis de 45 min, y aplicabilidad al análisis de muestras de dulces, patatas con queso y galletas dulces. Pese a las buenas prestaciones analíticas obtenidas, su fabricación implica múltiples reactivos, protocolos complejos de modificación de sustratos y empleo de nanomateriales, lo que dificulta su empleo para el desarrollo de dispositivos de fácil manejo que permitan el cribado de productos lácteos. El kit espectrofotométrico ELISA de la casa comercial Bethyl Laboratories, Inc., que emplea los mismos inmunoreactivos que las inmunoplateformas desarrolladas en esta Tesis, permite la cuantificación de β-LG en el intervalo de concentración comprendido entre $(1.95\text{--}125) \text{ ng mL}^{-1}$, en un tiempo de análisis de 135 min, y aplicabilidad demostrada al análisis de muestras de leche. Entre los kits ELISA comerciales más competitivos, en términos de sensibilidad, disponibles actualmente, destaca el de la casa comercial Biomatik, con un LD de 0.067 ng mL^{-1} , un tiempo de análisis de 230 min, y aplicabilidad para la determinación de β-LG en suero, plasma, lisados o cultivos celulares y leche.

α -LA

Para la determinación electroquímica de α -LA, posteriormente a la publicación del trabajo derivado de las investigaciones realizadas en esta Tesis Doctoral, se han propuesto otras estrategias basadas en la interacción de la lisozima y α -LA humana [Raouafi, 2017], [Mars, 2018], seleccionada como biomarcador de cáncer. Sin embargo, teniendo en cuenta la baja homología entre las proteínas α -LA bovinas y humanas, creemos que estas estrategias no podrían extrapolarse para la determinación fiable de la proteína alergénica α -LA de la leche de vaca. Los kits espectrofotométricos ELISA disponibles comercialmente para su determinación, de las casas comerciales Bethyl Laboratories, Inc. (que emplea los mismos inmunoreactivos que la inmunoplateforma desarrollada en esta Tesis Doctoral) y CUSABIO, permiten alcanzar LDs de 78 y 54 pg mL⁻¹, en tiempos de análisis de 150 y 270 min, respectivamente, y se ofertan fundamentalmente para la determinación de α -LA en sueros o fluidos biológicos.

Adulteración de productos lácteos con leche de diferente origen animal

Para la identificación de adulteraciones en productos lácteos con calostro o leche de la misma o distinta especie animal, el método de referencia, según el reglamento de la Comunidad Europea, es el enfoque isoeléctrico de las caseínas tratadas con plasmina, en presencia de urea, y tinción de las proteínas γ_3 - y γ_2 -caseínas [2018/150/UE]. Sin embargo, además de resultar excesivamente tediosa, esta técnica no ofrece los resultados deseados en el análisis de queso cuando este ha sufrido un proceso de maduración prolongado y sólo permite la detección de la leche de vaca en queso de otras especies. En la actualidad no se han desarrollado estrategias biosensoras electroquímicas para la identificación de leche de diferente origen animal, por lo que sólo pueden discutirse las características analíticas y los tiempos de análisis de los principales kits espectrofotométricos comerciales para la detección de IgGs bovinas, ovinas y caprinas. Los inmunorreactivos empleados en esta Tesis Doctoral, cedidos por la empresa ZEULAB S.L., son suministrados comercialmente como kits ELISA espectrofotométricos para la determinación de IgGs bovinas, ovinas y caprinas, con LDs de 70, 14 y 10 ng mL⁻¹, respectivamente, o para la identificación de adulteraciones (0.1 % de leche de vaca o cabra), en un tiempo de análisis de 90 min. También existen disponibles otros kits ELISA que ofrecen mejores prestaciones analíticas para la determinación de IgGs bovinas (Abcam, LD 1.245 ng mL⁻¹, tiempo de análisis

120 min), ovinas (Antibodies Online, LD 1.56 ng mL⁻¹, tiempo de análisis 60 min) y caprinas (Cloud Clone Corp, LD 1.95 ng mL⁻¹, tiempo de análisis 60 min).

Ara h 1

Debido a la importancia y potencial alergénico del cacahuete, se han desarrollado distintas estrategias electroquímicas inmunosensoras para la determinación de Ara h 1. Por orden de publicación, Huang y col. propusieron el primer inmunosensor impedimétrico para la determinación de Ara h 1, basado en el empleo de electrodos de disco de oro y SAMs para la inmovilización covalente de un anticuerpo específico, llevándose a cabo la monitorización de la reacción de reconocimiento antígeno-anticuerpo mediante EIS, en tan sólo 5 min, en presencia del sistema redox [Fe(CN)₆]^{4-/3-}, con un LD de 0.3 nM [Huang, 2008]. Singh y col., también desarrollaron un inmunosensor impedimétrico basado en la inmovilización del anticuerpo específico en los poros, recubiertos de oro, de membranas comerciales de policarbonato nanoporoso, monitorizándose, en este caso, directamente la disminución de la conductividad tras el reconocimiento de Ara h 1, proporcionando un LD de 0.04 µg mL⁻¹ [Singh, 2010]. Aunque el empleo de estas estrategias permite la monitorización directa de Ara h 1, hasta la fecha no se ha demostrado su aplicación real en el análisis de muestras alimentarias. También se han desarrollado inmunosensores tipo sándwich, basados en el empleo de SPCE modificados con AuNPs para la inmovilización del anticuerpo de captura. Tras la formación del inmunocomplejo tipo sándwich, se lleva a cabo la monitorización de la concentración de Ara h 1 mediante DPV empleando AP como etiqueta redox y 3-indoxil fosfato (3-IP) como sustrato enzimático, obteniendo un LD de 3.8 ng mL⁻¹ en un tiempo de análisis de 200 min. Además, esta estrategia se ha aplicado exitosamente a la detección de un 0.1 % de cacahuete en muestras de galleta y chocolate. Sus principales inconvenientes incluyen los largos tiempos requeridos, tanto para la fabricación del inmunosensor como para el análisis, y la falta de sensibilidad para la detección de cacahuete a niveles de traza [Alves, 2015-a]. En este punto, es importante destacar que el kit espectrofotométrico comercial, que emplea los mismos inmunoreactivos que las inmunoplateformas desarrolladas en esta Tesis Doctoral, suministrado por INDOOR Biotechnologies, permite el análisis de Ara h 1 en 240 min, con un LD de 31.5 ng mL⁻¹.

Ara h 2

Puesto que Ara h 2 está considerado como un biomarcador de sensibilización de elevada severidad frente al cacahuete, en la actualidad, las estrategias electroquímicas inmunosensoras asociadas a la sensibilización de Ara h 2 están enfocadas a la identificación de IgEs específicas en suero humano [Liu, 2010]. Sin embargo, no se han desarrollado inmunosensores electroquímicos para la determinación de esta proteína alergénica en muestras alimentarias. El kit espectrofotométrico ELISA de la casa comercial INDOOR Biotechnologies, que proporciona los inmunoreactivos empleados en esta Tesis Doctoral, permite la determinación de Ara h 2 en un tiempo de análisis de 240 min, con un LD de 2.0 ng mL^{-1} . Debido a la baja disponibilidad comercial de kits ELISA para la determinación de Ara h 2, Peng y col. compararon 5 anticuerpos monoclonales diferentes para su empleo como anticuerpo de captura, y desarrollaron un inmunoensayo ELISA tipo sándwich, con un LD de 0.02 ng mL^{-1} , en un tiempo de análisis de 135 min. El principal inconveniente radica en la necesidad de realizar todas las etapas de incubación a 37°C , lo que dificulta su aplicación en entornos descentralizados [Peng, 2015]. En este punto cabe destacar, que el gen que codifica la proteína Ara h 2 también se ha empleado ampliamente para el desarrollo de estrategias acopladas a PCR para la detección de cacahuete ($2\text{--}10 \text{ mg kg}^{-1}$) en muestras alimentarias, tanto crudas como procesadas [López-Calleja, 2013], [Köppel, 2010].

Cor a 9

Los genosensores electroquímicos desarrollados en la actualidad para la detección de avellana están acoplados a estrategias de amplificación mediante PCR. Aunque no están basados en el empleo del gen que codifica la proteína Cor a 9, se han descrito algunas estrategias interesantes que emplean el gen Cor a 1 como biomarcador de sensibilización. Brevemente, y por orden de publicación, Bettazi y col. desarrollaron una plataforma electroquímica multisensora formada por 8 electrodos de trabajo de oro, modificados con secuencias tioladas, complementarias a fragmentos de ADN característicos de las isoformas Cor a 1.03 y Cor a 1.04, basada en un formato de hibridación tipo sándwich con sondas de detección funcionalizadas con biotina, para su conjugación con AP, y detección mediante DPV. Esta estrategia se empleó para el análisis de los productos de amplificación obtenidos por PCR, con LDs de 0.3 y 0.1 nM para la detección de Cor a 1.03 y Cor a 1.04, respectivamente, en un tiempo de análisis de 125 min, y se aplicó al análisis de productos alimentarios libres o con contenidos

declarados de avellana [Bettazzi, 2008]. Además de la baja sensibilidad alcanzada, pese a su acoplamiento a estrategias de amplificación, sus principales inconvenientes radican en los largos tiempos de fabricación del array de ADN (16.5 h) y de análisis. También se han empleado MBs funcionalizadas con estreptavidina para el desarrollo de un genosensor electroquímico, basado en un formato de hibridación tipo sándwich, marcado enzimáticamente con AP para la determinación, empleando DPV, de un fragmento de ADN que codifica la proteína Cor a 1.04. Cabe destacar que, en la estrategia desarrollada, acoplada a PCR, se llevan a cabo las etapas de hibridación, marcaje enzimático y detección de forma automática, empleando un dispositivo microfluídico [Berti, 2009]. Sin embargo, pese a las ventajas que supone su acoplamiento a dispositivos microfluídicos, el LD alcanzado, de 0.2 nM, el tiempo necesario de análisis (de 96 min) y la ausencia de aplicación en matrices alimentarias reales, dificulta su aplicación para la identificación de avellana en la industria alimentaria.

OM

En la actualidad, la detección de esta proteína se basa únicamente en la metodología ELISA, no habiéndose desarrollado ninguna plataforma inmunosensora electroquímica para su determinación. Debido a la similitud, tanto en tiempos de análisis como de sensibilidad, únicamente se van a comentar las principales características del kit ELISA comercial, que emplea los mismos inmunoreactivos que los empleados en esta Tesis Doctoral para el desarrollo de la plataforma inmunosensora implementada. Este kit, suministrado por Zeulab S.L., permite la detección de 60 ng mL⁻¹ de OM en un tiempo de análisis de 60 min y permite detectar un 0.05 % (500 mg Kg⁻¹) de huevo en muestras alimentarias. Sin embargo, la necesidad de detección de alérgenos a los niveles que se consideran de relevancia para desencadenar una reacción alérgica (10 mg Kg⁻¹), dificulta la aplicación real de la metodología ELISA como método fiable para garantizar la ausencia de huevo a través de la determinación de OM.

Adulteraciones de muestras cárnicas con carne de caballo

En la actualidad no se ha desarrollado ninguna plataforma inmuno- o genosensora electroquímica para la identificación de adulteraciones en muestras cárnicas con carne de caballo. Según la Comisión Europea, en la Recomendación de la Comisión del

27 de marzo de 2014 (2014/180/UE), debe detectarse, como mínimo, un 0.5 % de carne de caballo en la carne (como relación de fracción en masa p/p), aunque no se especifica el método de detección [2014/180/UE]. Sin embargo, hasta la fecha, a excepción de la metodología desarrollada en esta Tesis Doctoral, sólo se ha conseguido alcanzar esa sensibilidad con metodologías acopladas a estrategias de PCR. En particular, uno de los últimos trabajos descritos en este campo, se basa en el empleo de PCR cuantitativa en tiempo real, para la detección de carne de caballo, y demuestra una elevada sensibilidad y especificidad, de 0.0001 % (p/p) de carne de caballo en mezclas de carne de vacuno, y 0.1 % (p/p) en muestras procesadas [Meira, 2017]. Sin embargo, los resultados alcanzados demuestran la degradación de las dianas de ADN de elevado tamaño en muestras cárnicas procesadas, lo que justifica la disminución significativa de la sensibilidad en este tipo de matrices [Ali, 2012-b]. Estas estrategias requieren, además, la extracción y amplificación del material genético. También existe disponible comercialmente un kit espectrofotométrico ELISA, suministrado por Sigma-Aldrich, que permite llevar a cabo la detección de carne de caballo (> 1.0 % (p/p)) en muestras crudas o procesadas, en 60 min. Su principal inconveniente es que se trata de un método cualitativo cuya sensibilidad no alcanza los niveles requeridos por la legislación.

Otras estrategias, desarrolladas en los últimos años debido al “boom” que supuso este tipo de adulteración, se basan en el análisis de los triglicéridos de la carne de caballo mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (^1H -NMR), sin validez en el análisis de mezclas de carnes [Jakes, 2015], en la detección de los aminoácidos mediante espectroscopia Raman, que es aplicable a la identificación de mezclas de carne por encima del 25 % [Zajac, 2014], la detección de péptidos específicos de caballo mediante la monitorización de reacciones múltiples, las técnicas proteómicas y la espectrometría de masas [Bargen, 2014], o la detección de polimorfismos genéticos mediante resonancia magnética nuclear [Serpa, 2017]. Aunque la mayoría de estas metodologías presentan tratamientos de muestra o procesos de extracción relativamente sencillos, su limitada sensibilidad y necesidad de especialistas para su evaluación dificultan su empleo para la autenticación de muestras cárnicas.

Tabla 2.3. Inmunosensores y genosensores electroquímicos propuestos, kits ELISAs comerciales disponibles y estrategias PCR para la determinación de las proteínas β -LG, α -LA, Ara h 1, Ara h 2, OM, de las IgGs bovinas, ovinas y caprinas, y de fragmentos de ADN característicos de avellana y carne de caballo.

Analito	Metodología o Referencia del kit comercial	Técnica-detección	Características analíticas	Tiempo de análisis	Muestra y nivel detectado	Referencia o casa comercial
β -LG	Inmunosensor voltamperométrico, libre de marcaje, basado en “electrografting” sobre SPCEs modificados con grafeno	DPV (-0.3 – +0.4 V) ([Fe(CN) ₆] ^{4-/3-})	LD: 0.85 pg mL ⁻¹	45 min	Dulces, patatas con queso y galletas dulces	[Eissa, 2012]
	Bovine beta-Lactoglobulin ELISA Quantitation Set, E10-125	ELISA	I.L: (1.95–125) ng mL ⁻¹	135 min	Muestras de leche	Bethyl Laboratories, Inc.
	Cattle Beta-Lactoglobulin (β Lg) ELISA kit, Cat#EKU02707	ELISA	LD: 0.067 ng mL ⁻¹	230 min	Suero, plasma, lisados o cultivos celulares y leche	Biomatik
α -LA	Bovine alpha-Lactalbumin ELISA Quantitation	ELISA	LD: 78 pg mL ⁻¹	150 min	Suero y otros fluidos biológicos	Bethyl Laboratories, Inc.
	Bovine α Lactalbumin, α -La ELISA Kit	ELISA	LD: 54 pg mL ⁻¹	270 min	Suero o plasma	CUSABIO
IgG bovina	RC Bovino	ELISA	LD: 70 ng mL ⁻¹	90 min	Leche de vaca 0.1 % (v/v)	ZEULAB
	Bovine IgG ELISA Kit (ab205078)	ELISA	LD: 1.245 ng mL ⁻¹	120 min	Leche, suero, plasma, cultivo celular	Abcam
IgG ovina	RC Ovino	ELISA	LD: 14 ng mL ⁻¹	90 min	–	ZEULAB
	IgG ELISA Kit	ELISA	LD: 1.56 ng mL ⁻¹	60 min	–	Antibodies online
IgG caprina	RC Caprino	ELISA	LD: 10 ng mL ⁻¹	90 min	Leche de cabra 0.1 % (v/v)	ZEULAB
	ELISA Kit for Immunoglobulin G (IgG)	ELISA	LD: 1.95 ng mL ⁻¹	120 min	–	Cloud Clone Corp
Ara h 1	Inmunosensor impedimétrico	EIS [Fe(CN) ₆] ^{4-/3-}	LD: 0.3 nM	5 min	–	[Huang, 2008]

Tabla 2.3 (continuación). Inmunosensores y genosensores electroquímicos propuestos, kits ELISAs comerciales disponibles y estrategias PCR para la determinación de las proteínas β -LG, α -LA, Ara h 1, Ara h 2, OM, de las IgGs bovinas, ovinas y caprinas, y de fragmentos de ADN característicos de avellana y carne de caballo.

Analito	Metodología o Referencia del kit comercial	Técnica-detección	Características analíticas	Tiempo de análisis	Muestra y nivel detectado	Referencia o casa comercial
Ara h 1	Inmunosensor impedimétrico basado en el empleo de membranas porosas modificadas con oro	Impedancia	LD: 0.04 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Directo	–	[Singh, 2010]
	Inmunosensor electroquímico basado en el empleo de SPCE y AuNPs	DPV (3-IP)	LD: 3.8 ng mL ⁻¹	200 min	Galletas y chocolate con 0.1 % (p/p) de cacahuete	[Alves, 2015-a]
	ELISA kit for measuring <i>Arachis hypogaea</i> allergen, Ara h 1	ELISA	LD: 31.5 ng mL ⁻¹	240 min	–	INDOOR Biotechnologies
Ara h 2	ELISA kit for measuring <i>Arachis hypogaea</i> allergen, Ara h 2	ELISA	LD: 2 ng mL ⁻¹	240 min	–	INDOOR Biotechnologies
	Inmunoensayo ELISA tipo sándwich	ELISA	LD: 0.02 ng mL ⁻¹	135 min	Cacahuetes, nueces, algas marinas, barritas con cacahuete y chocolate con cacahuete	[Peng, 2015]
Cor a 9	Array de ADN electroquímico para Cor a 1.03 y Cor a 1.04 acoplado a PCR	DPV (AP)	Cor a 1.03 LD: 0.3 nM Cor a 1.04 LD: 0.1 nM	125 min	Productos alimentarios libres o con contenidos declarados de avellana	[Bettazzi, 2008]
	Genosensor electroquímico basado en un dispositivo microfluídico y PCR	DPV (AP)	Cor a 1.04 LD: 0.2 nM	96 min	–	[Berti, 2009]
OM	Proteon ELISA Egg	ELISA	LD: 60 ng mL ⁻¹	60 min	0.05 % (p/p) de huevo	ZEULAB
Carne de caballo	Horse Raw Meat Species ELISA Kit	ELISA	–	60 min	> 1.0 % (p/p)	Sigma-Aldrich
	PCR cuantitativa	PCR	–	56 min	Muestras crudas 0.0001 % (p/p) y procesadas 0.1 % (p/p)	[Meira, 2017]

α -LA: α -lactalbúmina, AP: fosfatasa alcalina; β -LG: β -lactoglobulina, DPV: voltamperometría diferencial de impulsos; EIS: espectroscopia de impedancia electroquímica; ELISA: ensayo de immunoabsorción ligado a enzimas; I.L: intervalo lineal; LD: límite de detección; OM: ovomucoide, PCR: reacción en cadena de la polimerasa; SPCE: electrodo serigrafiado de carbono; 3-IP: 3-indoxil fosfato.

3.1. Instrumentación

3.2 Reactivos y disoluciones

3.3. Procedimientos experimentales

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentación

3.1.1. Instrumentos y aparatos

En este apartado se describen tanto los aparatos empleados en la fabricación de los biosensores desarrollados en esta Tesis Doctoral, como los instrumentos usados para realizar las medidas electroquímicas.

- **Incubadores MT100 (Universal Labortechnik), (AIMAN GZ) y Optic Ivymen® System (Comecta S.A, Scharlab)** provistos de un sistema de control de la temperatura y agitación, empleados para la modificación de los diferentes tipos de partículas magnéticas comerciales (MBs).
- **Concentrador magnético Dynal MPC-S (product no. 120.20, Dynal Biotech ASA)** empleado para la captura de las MBs modificadas durante los procesos de lavado.
- **Cabina de seguridad microbiológica de flujo laminar Telstar BioSTAR (mod. AH-100)** para la manipulación de biosensores basados en el empleo de ARNs sintéticos.
- **Autoclave Trade Raypa®** empleado para la esterilización (a 121 °C y 1 atm de presión) del material y disoluciones requeridas para el desarrollo de biosensores que emplean oligonucleótidos de ARN.

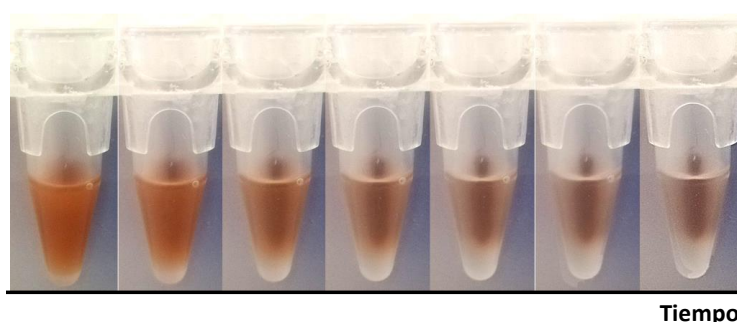


Fig. 3.1: Suspensión de MBs en disolución durante su captura, empleando el concentrador magnético Dynal MPC-S. Imágenes reales ordenadas de izquierda a derecha de menor a mayor tiempo de imantación.

- **Impresora semiautomática MMP-SPM** (Speedline Technologies, Franklin, MA) para la fabricación de electrodos serigrafiados de carbono o grafito-Prussian blue.
- **Bipotenciostato CHI812B (CH Instruments, Inc.)** controlado por el software CHI812B, empleado para la obtención individual o dual de medidas amperométricas.
- **Multi Potenciostato/Galvanostato μ Stat 8000 (Metrohm-DropSens S.L.)** controlado por el software DropView 8400, empleado para la obtención de medidas amperométricas múltiples.
- **Potenciostato CHI1230A (CH Instruments, Austin, TX)** controlado mediante el software CHI1230A, empleado para la obtención de medidas voltamperométricas (CV) y cronoamperométricas.

3.1.2. Electrodos y dispositivos empleados para las medidas electroquímicas

A continuación, se enumeran los electrodos serigrafiados y dispositivos, tanto comerciales como diseñados por el grupo de investigación, empleados para llevar a cabo las medidas electroquímicas.

- **Electrodos serigrafiados individuales de carbono (SPCEs)** (DRP-110, 3.4×1.0×0.05 cm, Metrohm-DropSens S.L) que contienen un electrodo de trabajo de carbono ($\phi = 4$ mm, $A = 12.56$ mm²), un contraelectrodo de carbono y un electrodo de pseudo-referencia de Ag, impresos en su superficie (Fig. 3.2 a).
- **Electrodos serigrafiados duales de carbono (SPdCEs)** (DRP-C1110, 3.4×1.0×0.05 cm, Metrohm-DropSens S.L), que contienen dos electrodos de trabajo elípticos ($A = 6.3$ mm²), un contraelectrodo de carbono y un electrodo de pseudo-referencia de Ag, impresos en su superficie (Fig. 3.2 b).
- **Electrodos serigrafiados múltiples de carbono (SPC4Es)** (DRP-4W110, 3.8×2.0×0.1 cm, Metrohm-DropSens S.L), que contienen cuatro electrodos de trabajo ($\phi = 2.95$ mm, $A = 7.4$ mm²), un contraelectrodo de carbono y un electrodo de pseudo-referencia de Ag, impresos en su superficie (Fig 3.2 c).

- **Cables conectores** para electrodos serigrafiados individuales (SPCE) (Ref. CAC), duales (SPdCE) (Ref. BICAC) y para multiplexado (SPC4E) (Ref. CONNECT4W) (Metrohm-DropSens S.L).
- **Carcasas de teflón** de fabricación casera provistas de uno, dos o cuatro imanes de neodimio (AIMAN GZ) embutidos para la captura controlada y reproducible de las MBs modificadas sobre los electrodos de trabajo de SPCE, SPdCE y SPC4E, respectivamente (Fig. 3.2).

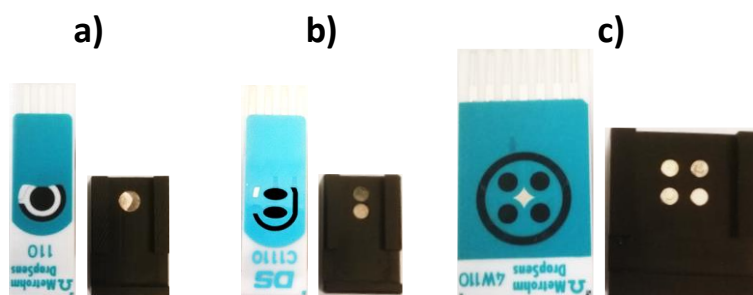


Fig. 3.2: Electrodo serigrafiado de carbono comercial y carcasa de teflón de fabricación casera, provistas de imanes, empleados para determinaciones individuales (SPCE, a), duales (SPdCE, b) o multiplexadas (SPC4E, c).

3.1.3. Otra instrumentación empleada

En este apartado se recoge la instrumentación complementaria empleada en la preparación de disoluciones y matrices alimentarias, además de la utilizada para realizar los procesos de extracción y/o aislamiento de proteínas o ácidos nucleicos.

- Centrífugas MPW-65R (Biogen Científica, Madrid, España), Cencom (J.P. Selecta S.A., Barcelona, España), 5424 (Eppendorf) y Heraeus Multifuge 3 SR plus (Thermo Scientific).
- Liofilizador (Telstar).
- Microscopio de fluorescencia Evos FL Imaging system con un filtro GFP.
- Mortero de porcelana.
- NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies).

- pH-metros de precisión Crison Basic 20+ y Seven Easy (Mettler-Toledo, Switzerland), calibrados de forma habitual con disoluciones reguladoras de pH 7.00, 4.00 y 9.21 a $(25 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$.
- Sistema de electroforesis horizontal: cubeta, porta-geles, peines y cables de corriente (Bio-Rad).
- Termociclador SensoQuest LabCycler (Progen Scientific Ltd.).
- Vórtex AGT-9 (Bunsen) y Maxi-Mix (Type 16700 Mixer).

3.2. Reactivos y disoluciones

3.2.1. Reactivos

En este apartado se recogen los diferentes reactivos empleados a lo largo de esta tesis doctoral, clasificados en función de sus características o uso. Todos los reactivos y disolventes empleados fueron de calidad para análisis.

3.2.1.1. Reactivos empleados en el desarrollo de biosensores magnéticos

Reactivos empleados para la fabricación de inmunosensores:

A continuación, se recogen los reactivos empleados de forma general para la modificación de MBs funcionalizadas con grupos carboxílicos, como los bioreactivos empleados de forma específica para cada plataforma inmunosensora desarrollada, ordenados por orden de aparición en el apartado de Resultados y Discusión.

- Partículas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxílicos (HOOC-MBs), (Dynabeads® M270 Carboxylic Acid, $\phi = 2.8 \mu\text{m}$, 10 mg mL^{-1} , Invitrogen Dynal AS).
- N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, Acros Organics).
- N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS, Fluorochem).
- Etanolamina (ET, Sigma-Aldrich®).
- **Inmunosensor para β -Lactoglobulina** (Bovine beta-Lactoglobulin ELISA Quantitation (Set, E10-125, Bethyl Laboratories)):
 - Estándar de β -Lactoglobulina bovina (β -LG) (Sigma-Aldrich).
 - Anticuerpo de conejo específico de β -LG bovina (anti- β -LG) (A10-125A, Bethyl Laboratories).
 - Anticuerpo de conejo conjugado con HRP específico de β -LG bovina (anti- β -LG-HRP) (A10-125P, Bethyl Laboratories).

- **Inmunosensor para α -Lactoalbúmina** (Bovine alpha-Lactalbumin ELISA Quantitation (Set, E10-128, Bethyl Laboratories)):
 - Estándar de α -lactoalbúmina bovina (α -LA) (RC10-128-5, Bethyl Laboratories).
 - Anticuerpo de cabra específico de α -LA bovina (anti- α -LA) (A10-128A, Bethyl Laboratories).
 - Anticuerpo de cabra conjugado con HRP específico de α -LA bovina (anti- α -LA-HRP) (A10-128P, Bethyl Laboratories).
- **Inmunosensor para Ara h 1** (Ara h 1 ELISA kit, EL-AH1, Indoor Biotechnologies):
 - Estándar de Ara h 1 (Indoor Biotechnologies).
 - Anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 específico de Ara h 1 (anti-Ara h 1) (2C12, clon 2C12 A11 A3, Indoor Biotechnologies).
 - Anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 conjugado con biotina específico de Ara h 1 (b-anti-Ara h 1) (2F7, clon 2F7C12 D10, Indoor Biotechnologies).
 - Conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano (Estrep-HRP) (500 U, Sigma-Aldrich).
- **Inmunosensor para Ara h 2** (Ara h 2 ELISA kit, EL-AH2, Indoor Biotechnologies):
 - Estándar de Ara h 2 (Indoor Biotechnologies).
 - Anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 específico de Ara h 2 (anti-Ara h 2(C)) (1C4, clon 1C4 G4 A9, Indoor Biotechnologies).
 - Anticuerpo policlonal de conejo específico de Ara h 2 (anti-Ara h 2(D)) (Indoor Biotechnologies).
 - Fragmento de anticuerpo conjugado con HRP específico de inmunoglobulinas de conejo (F(ab')₂-HRP, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc).
- **Inmunosensor para ovomucoide:**
 - Ovomucoide de clara de huevo de gallina (OM) (Sigma-Aldrich).
 - Anticuerpo policlonal de conejo específico de OM (cedido por la empresa ZEULAB S.L.) sin conjugar (anti-OM) o conjugado con HRP (anti-OM-HRP).

- **Inmunosensor para IgGs bovinas:**

- Inmunoglobulinas G de suero bovino (IgG-Bov) (95 %, Sigma-Aldrich).
- Anticuerpo policlonal específico de IgG-Bov (cedido por la empresa ZEULAB S.L.) sin conjugar (anti-Bov) y conjugado con HRP (anti-Bov-HRP).

- **Inmunosensor para IgGs ovinas:**

- Inmunoglobulinas G de suero ovino (IgG-Ovi) (95 %, Sigma-Aldrich).
- Anticuerpo policlonal específico de IgG-Ovi (cedido por la empresa ZEULAB S.L.) sin conjugar (anti-Ovi) y conjugado con HRP (anti-Ovi-HRP).

- **Inmunosensor para IgGs caprinas:**

- Inmunoglobulinas G de suero caprino (IgG-Cap) (95 %, Sigma-Aldrich).
- Anticuerpo policlonal específico de IgG-Cap (cedido por la empresa ZEULAB S.L.) sin conjugar (anti-Cap) y conjugado con HRP (anti-Cap-HRP).

Compuestos ensayados como interferentes:

- Ácido ascórbico (Fluka).
- Albúmina de clara de huevo (OVA, Sigma–Aldrich).
- Albúmina de suero bovino (BSA tipo VH, Gerbu).
- Avidina de clara de huevo de gallina (Sigma-Aldrich).
- Catalasa (Sigma-Aldrich).
- Conalbúmina de clara de huevo de gallina (Sigma-Aldrich).
- Fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich).
- Caseína (Sigma-Aldrich).
- Lactoperoxidasa (LPO, Abcam).
- Lisozima de clara de huevo de gallina (L-6876, Sigma-Aldrich).
- Riboflavina de clara de huevo de gallina (Sigma-Aldrich).

Reactivos empleados para la fabricación de biosensores de ácidos nucleicos:

A continuación, se describen los reactivos empleados para la fabricación de biosensores desarrollados para la determinación de ácidos nucleicos.

- Partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina (Estrep-MBs), (Dynabeads® M-280 Streptavidin, $\phi = 2.8 \mu\text{m}$, 10 mg mL^{-1} , Invitrogen Dynal AS).
- Partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G (ProtG-MBs) (Dynabeads® Protein G, $\phi = 2.8 \mu\text{m}$, 30 mg mL^{-1} , Invitrogen Dynal AS).
- Anticuerpo selectivo a heterohíbridos ADN-ARN ($\text{Ab}_{\text{ADN-ARN}}$) (Clon: D5H6, Covalab).
- Anticuerpo de cabra conjugado con HRP específico de inmunoglobulinas de ratón (anti-IgG-HRP) (ab97265, Abcam).
- Conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano (Estrep-HRP) (500 U, Sigma-Aldrich).
- Fragmento de anticuerpo conjugado con HRP específico de fluoresceína (anti-FITC-HRP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).
- Proteína A conjugada con HRP (ProtA-HRP, Sigma-Aldrich).
- Proteína A conjugada con un homopolímero que contiene 40 moléculas de HRP (ProtA-poli-HRP40, antibodies-online).

Las secuencias sintéticas de ADN y ARN empleadas, sin modificar o modificadas con biotina (b) o fluoresceína (FITC) (suministradas por Sigma-Aldrich), se recogen en la Tabla 3.1. Tras su recepción se reconstituyeron en el volumen adecuado de agua esterilizada libre de RNasas para obtener una concentración final de $100 \mu\text{M}$ y se almacenaron en alícuotas de pequeño volumen ($5.0 \mu\text{L}$) a -20 (ADN) o -80 °C (ARN o secuencias modificadas con FITC).

Tabla 3.1. Secuencias sintéticas de oligonucleótidos empleados en esta Tesis Doctoral, indicando su nomenclatura, función y el formato/biosensor en el que se han empleado.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Función	Formato/Biosensor
Cor a 9¹	GAATGGGAGCGACAGGAGAGACAAGAGA GGGAGAGTGAGCAAGAGCGGGA	Secuencia diana	Avellana
b-Cp (Cor a 9)	Biotin-TCCCGCTCTTGCTCACTCTCCCTCT	Sonda de captura	Avellana
b-Dp (Cor a 9)	CTTGTCTCTCCTGTCGCTCCCATTC-Biotin	Sonda de detección	Avellana
C.I	TCCCGCTCTTGCTCACTCTC	Cebador inverso	Avellana
C.D(100)	GTCAAAGTGGAAGGCAGGCTT	Cebador directo	Avellana
C.D(70)	GGCCGGAAAGGTCGCGTCAG	Cebador directo	Avellana
C.D(50)	GAATGGGAGCGACAGGAGAG	Cebador directo	Avellana
C.D(46)	GGGAGCGACAGGAGAGACAA	Cebador directo	Avellana
D-loop²	ATAACACCATACCCACCTGACATGCAATATCTTATGAATGGCCTATGT	Secuencia diana	[1-11]*
b-ADNCp	Biotin-ACATAGGCCATTCATAAGATATTG	Sonda de captura	[1, 2 y 5]*
b-ADNDp	CATGTCAGGTGGGTATGGTGTTAT-Biotin	Sonda de detección	[1]*
FITC-ADNDp	CATGTCAGGTGGGTATGGTGTTAT-FITC	Sonda de detección	[2]*
b-ARN Cp-24mer	Biotin-ACAUAGGCCAUUCAUAAGAUUUG	Sonda de captura	[3, 6 y 10]*
b-ARN Cp-40mer	Biotin-ACAUAGGCCAUUCAUAAGAUUUGCAUGUCAGGUGGGUUAU	Sonda de captura	[4, 7, 8, 9 y 11]*
FITC-Target	ATAACACCATACCCACCTGACATGCAATATCTTATGAATGGCCTATGT-FITC	Secuencia diana modificada	[3 y 4]*
ADNDp-Janus	CATGTCAGGTGGGTATGGTGTTATATGATGACGGCCACT	Sonda de detección/precursora	[5]*
FITC-AP1	FITC-GCACCTGGGGGAGTAAGTGGCCGTCATCAT	Concatámeros	[5]*
FITC-AP2	ACTCCCCCAGGTGCATGATGACGGCCACT-FITC	Concatámeros	[5]*
EQ2 D	TTCTTCCCCTAAACGACAACA	Cebador directo	PCR-Caballo
EQ2 I	ATTCATGGGGCAGACAATTT	Cebador inverso	PCR-Caballo

1: Región específica de la secuencia que codifica la proteína alergénica Cor a 9 [Iniesto, 2013]; * Trabajo comparación formatos (apartado 4.3.2).

2: Copia de un fragmento específico del haplotipo de ADN mitocondrial ID65 D-loop de Equus caballus [Ishida, 1994].

3.2.1.2. Reactivos empleados en la preparación de biosensores enzimáticos y comestibles con recubrimientos temporales

- Aceite de olive virgen extra (Filippo Berio, Europa).
- Carbón activo comestible (Nature's Way Products, Inc., Green Bay, WI).
- Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, Type X-S (GOx) (EC 1.1.3.4, Sigma-Aldrich).
- Quitosano (Sigma-Aldrich).
- Polímero comercial Eudragit® L100 (Evonik Industries, Germany).
- Polímero comercial Eudragit® E PO (Evonik Industries, Germany).
- Tinta de carbono: conductive carbon ink (E3449, Ercon Inc. Wareham, MA).
- Tinta de Ag/AgCl: conductive silver/silver chloride ink (E2414, Ercon Inc. Wareham, MA).
- Tinta de grafito-Prussian blue: conductive Prussian blue (PB)/graphite ink (C2070424P2, Gwent Inc. Torfaen, UK).

3.2.1.3. Reactivos empleados en la preparación de disoluciones

- Ácido acético (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ).
- Ácido acético glacial (Scharlau).
- Ácido etilendiaminotetraacético (AEDT, Merck).
- Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES, Gerbu).
- ADN AmpliTools Fast Master Mix 2× (Biotools).
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, Sigma–Aldrich).
- Carbonato sódico (Na₂CO₃, Panreac).
- Clorhidrato de tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris-HCl, 99 % Scharlau).
- Cloroformo (Scharlau).
- Cloruro de potasio (KCl, Scharlau).

- Cloruro de sodio (NaCl, 99.8 %, Scharlau).
- D(+)-glucosa (Sigma-Aldrich).
- Disolución bloqueante comercial de PBS suplementada con caseína al 1 % (p/v), (Thermo Scientific Cat. No: 37528, Waltham, MA, USA).
- PBS (1.0 M, pH 7.4) (Sigma-Aldrich).
- Dodecil sulfato sódico (SDS, Sigma-Aldrich).
- Etanol (100% Fisher Scientific).
- Ferricianuro potásico ($K_3[Fe(CN)_6]$, Fisher Scientific).
- Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4 , 99 %, Scharlau).
- Fosfato monosódico dihidratado ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 99 %, Scharlau).
- Gelatina de piel de vacuno (type B) (Sigma-Aldrich).
- Hexacianoferrato de potasio (II) trihidrato ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$, Sigma-Aldrich).
- Hidrogenocarbonato de sodio ($NaHCO_3$, Scharlau).
- Hidroquinona (HQ, ≥ 99.5 %, Sigma-Aldrich).
- Hidróxido sódico (NaOH, Scharlab).
- Hidróxido potásico (KOH, Scharlab).
- Isotiocianato de fluoresceína (FITC, $\lambda_{em} = 514$ nm) (Sigma-Aldrich).
- Leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana).
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 30 % v/v, Sigma-Aldrich).
- 2-Propanol (Fisher Scientific).
- Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (AEDT, Merck).
- Disoluciones simuladas de fluido gástrico (libres de enzimas) (G) (Sigma-Aldrich).
- Disoluciones simuladas de fluido intestinal (libres de enzimas) (I) (Sigma-Aldrich).
- Triton X-100 (Fisher Scientific).
- Kit de extracción de ADN genómico de plantas: PowerPlant Pro DNA Isolation commercial kit (MoBio, CA, USA).
- Kit de extracción de plásmidos: Speedtools plasmid DNA purification kit (Biotools).
- Kit de extracción de ADN total: G-SpinTM Total DNA extraction kit (Intron Biotechnology).

3.2.2. Preparación de disoluciones

Para la preparación de todas las disoluciones empleadas, se ha utilizado agua desionizada obtenida mediante un sistema de purificación Millipore Mili-Q (18 M Ω cm a 25 °C). Los procedimientos empleados para la preparación de las distintas disoluciones, agrupadas según su uso, se indican a continuación:

3.2.2.1. Disoluciones reguladoras

- **Disolución de ácido acético 0.1 M:** se diluyen 295 μ L de la disolución comercial en 50 mL de agua desionizada.
- **Disolución [Fe(CN) $_6$] $^{4-/3-}$ 5 mM:** se prepara disolviendo 82.3 mg de K $_3$ [Fe(CN) $_6$] y 105.6 mg de K $_4$ [Fe(CN) $_6$] \cdot 3 H $_2$ O en 50 mL de PBS 0.1 M (pH 6.5).
- **Disolución de glucosa 1 M:** se prepara disolviendo 1.86 g de D(+)-glucosa (97.0 %) en 10 mL de PBS 0.1 M (pH 6.5).
- **Disolución de H $_2$ O $_2$ 0.1 M:** se prepara diluyendo 51 μ L de la disolución comercial al 30 % (v/v) en 5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0). Esta disolución se prepara justo antes de su uso.
- **Disolución de HQ 0.1 M:** se prepara disolviendo 22 mg de HQ en 2.0 mL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0). Esta disolución se prepara inmediatamente antes de su empleo.
- **Disolución reguladora de carbonato 50 mM (pH 9.6):** se prepara disolviendo 80 mg de carbonato sódico y 146 mg de bicarbonato sódico en 50 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución reguladora de fosfato 1.0 M (pH 6.0):** se prepara disolviendo 8.44 g de Na $_2$ HPO $_4$ y 129.79 g de NaH $_2$ PO $_4$ \cdot 2H $_2$ O en 1 L de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0):** se prepara por dilución de la disolución reguladora de fosfato 1.0 M en agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.

- **Disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 8.0):** se prepara disolviendo 0.613 g de Na_2HPO_4 y 0.095 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **PBS 0.1 M (pH 6.5):** se prepara por dilución de PBS 1.0 M (pH 7.4) comercial en agua desionizada, ajustándose el pH con HCl 2.0 M.
- **PBS 0.1 M (pH 7.5):** se prepara por dilución de PBS 1.0 M (pH 7.4) comercial en agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.

3.2.2.2. Disoluciones empleadas en la fabricación de los biosensores

- **Disoluciones de anticuerpos de captura:** se preparan por dilución adecuada de las disoluciones comerciales en MES 0.025 M (pH 5.0) o PBS 0.01 M (pH 7.5), para su inmovilización sobre MBs funcionalizadas con grupos carboxílicos o proteína G, respectivamente. En el apartado 3.3.3.1 se indican las concentraciones específicas.
- **Disoluciones de anticuerpos de detección:** se preparan por dilución adecuada de las disoluciones comerciales en PBST 0.01 M (pH 7.5) o disolución bloqueante de caseína, en función del biosensor empleado. En el apartado 3.3.3.2 y 3.3.3.3 se indican las concentraciones específicas.
- **Disoluciones de antígenos:** se preparan por dilución o disolución adecuada de las disoluciones o reactivos comerciales, respectivamente, en PBST 0.01 M (pH 7.5) o solución bloqueante de caseína en función del biosensor empleado.
- **Disolución de EDC/Sulfo-NHS 50 mg mL^{-1} (pH 5.0):** se prepara justo antes de su empleo disolviendo 10 mg de EDC y 10 mg de Sulfo-NHS en 200 μL de disolución reguladora de MES 0.025 M (pH 5.0).
- **Disolución de etanolamina 1 M:** se prepara diluyendo 30 μL de etanolamina comercial (99 %) en 470 μL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 8.0).
- **Disolución de quitosano al 0.5 % (p/v):** se prepara disolviendo 5 mg de quitosano en 1.0 mL de ácido acético 0.1 M.
- **Disolución de GOx 40 mg mL^{-1} suplementada con BSA 10 mg mL^{-1} :** se prepara disolviendo 40 mg de GOx y 10 mg de BSA en 1.0 mL de PBS 0.1 M (pH 6.5).

- **Disoluciones de compuestos ensayados como interferentes:** se preparan por disolución adecuada de los reactivos comerciales en PBST 0.01 M (pH 7.5) o disolución bloqueante de caseína, en función del biosensor empleado. Las concentraciones específicas se indican en los apartados 4.1 y 4.2.
- **Disoluciones de marcadores enzimáticos:** se preparan por dilución adecuada de las disoluciones comerciales en PBST 0.01 M (pH 7.5) o disolución bloqueante de caseína, en función del biosensor empleado. En los apartados 3.3.3.2, 3.3.3.3 y 3.3.4 se indican las concentraciones específicas.
- **Disolución del polímero Eudragit® E PO al 4.0 u 8.0 % (p/v):** se prepara por disolución adecuada del precursor Eudragit® E PO en etanol suplementado con SDS 0.05 % (p/v).
- **Disolución del polímero Eudragit® L100 al 2.0, 4.0, 8.0 o 16.0 % (p/v):** se prepara por disolución adecuada del precursor Eudragit® L100 en isopropanol suplementado con SDS 0.05 % (p/v).
- **Disolución del polímero Eudragit® L100 al 16.0 % (w/v) suplementado con FITC 0.5 % (p/v):** se prepara una disolución de Eudragit® L100 al 16.0 % (w/v) de la forma indicada y se suplementa con FITC 0.5 % (p/v).
- **Disoluciones de secuencias de oligonucleótidos:** se preparan por dilución adecuada de las disoluciones sintéticas de 100 μ M en Tris-HCl 0.1 M (pH 7.2), PBS 0.01 M (pH 7.5) o disolución bloqueante de caseína, en función del biosensor empleado. En el apartado 3.3.4 se especifican las concentraciones.
- **Disoluciones de sondas de captura biotiniladas:** se preparan por dilución adecuada de las disoluciones sintéticas de 100 μ M en B&W, para su inmovilización sobre las MBs funcionalizadas con estreptavidina. Las concentraciones específicas se indican en el apartado 3.3.4.
- **Disolución reguladora Binding and Washing (B&W, pH 7.5):** se prepara disolviendo 0.39 g de Tris-HCl, 0.09 g de AEDT y 29.22 g de NaCl en 250 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución reguladora de Tris-HCl 0.1 M (pH 7.2):** se prepara disolviendo 0.788 g de Tris-HCl en 50 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución reguladora de MES 0.025 M (pH 5.0):** se prepara disolviendo 1.22 g de MES en 250 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.

- **Disolución reguladora de PBS 0.01 M (pH 7.5):** se prepara disolviendo 0.946 g de Na_2HPO_4 , 0.399 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.006 g de NaCl y 0.201 g de KCl en 1 L de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución reguladora de PBST 0.01 M (pH 7.5):** se prepara una disolución de PBS 0.01 M de la forma indicada y se suplementa con Tween[®]20 0.05 % (v/v).

3.2.2.3. Disoluciones empleadas para la extracción de proteínas o ácidos nucleicos

- **Disolución reguladora de Tris-HCl 0.1 M (pH 8.2) suplementada con NaCl al 1.0 % (p/v):** se prepara disolviendo 0.788 g de Tris-HCl y 0.5 g de NaCl en 50 mL de agua desionizada y se ajusta el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución Tris-HCl 100 mM, NaCl 1.4 M y AEDT 20 mM (pH 8.0):** se prepara disolviendo 1.58 g de Tris-HCl, 8.18 g de NaCl y 0.74 g de AEDT en 100 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2 M.
- **Disolución CTAB 2.0 % (v/v):** se prepara diluyendo 0.1 mL de CTAB en 5.0 mL de Tris-HCl 100 mM, NaCl 1.4 M y AEDT 20 mM (pH 8.0).
- **Disolución I (Tris-HCl 25 mM, glucosa 50 mM y AEDT 10 mM) (pH 8.0):** se prepara disolviendo 1.97 g de Tris-HCl, 4.5 g de glucosa y 1.86 g de AEDT en 500 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución III:** se prepara diluyendo 29.5 mL ácido acético glacial en 100 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con KOH en grano hasta pH 4.8.
- **Disolución MLB (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM y 50 mM AEDT) (pH 8.0):** se prepara disolviendo 0.79 g de Tris-HCl, 4.38 g de NaCl y 9.31 g de AEDT en 500 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución de SDS 2.0 % (p/v) suplementada con NaOH 0.4 M:** se prepara disolviendo 0.1 g de SDS y 0.2 mL de NaOH 10 M en 5 mL de agua desionizada.

3.2.2.4. Disoluciones sintéticas simuladas del tracto digestivo o fluidos complejos

- **Disolución de gelatina de piel de vacuno 50 mg L⁻¹:** se prepara disolviendo 0.1 mg de gelatina de piel de vacuno en 2.0 mL de PBS 0.1 M (pH 6.5).
- **Disolución de Triton X-100 5000 mg L⁻¹:** se prepara diluyendo 9.4 µL de Triton X-100 en 2.0 mL de PBS 0.1 M (pH 6.5).
- **Disolución simulada de fluido intestinal (I) (pH 6.5):** se prepara por dilución adecuada en agua desionizada siguiendo las especificaciones del producto comercial.
- **Disolución simulada de fluido gástrico (G) (pH 1.5 o 5.0):** se prepara por dilución adecuada en agua desionizada siguiendo las especificaciones del producto comercial, ajustándose el pH con HCl 2.0 M.

3.3. Procedimientos experimentales

En este apartado se describen los protocolos empleados para la extracción proteica y genética y amplificación por PCR de muestras alimentarias, y los puestos a punto para el desarrollo de plataformas biosensoras electroquímicas para el análisis individual o múltiple de los analitos de interés.

3.3.1. Protocolos de extracción y aislamiento de proteínas y ácidos nucleicos

A continuación, se describen los protocolos empleados para la extracción y/o aislamiento del material genético y proteico presente en matrices alimentarias.

- **Extracción de las proteínas hidrosolubles del cacahuete:**

Para la extracción de las proteínas hidrosolubles presentes en el cacahuete se introducen 0.5 g de muestra (previamente triturada y homogeneizada) en tubos de plástico, se adicionan 5 mL de Tris-HCl (0.1 M, pH 8.2, suplementado al 1 % con NaCl) y se incuba la mezcla a 60 °C durante toda la noche bajo agitación continua. Posteriormente se lleva a cabo el aislamiento de la fase acuosa mediante centrifugación. Para ello se realiza una primera centrifugación a 3600 rpm durante 10 min, recogiendo una alícuota de 1.0 mL del sobrenadante que se centrifuga de nuevo a 10000 rpm durante 3 min a 4 °C [Pele, 2007], [Pollet, 2011]. En el análisis particular de muestras que contenían chocolate, estas se congelaban a -20 °C antes de su empleo, y se adicionaban a la mezcla de extracción 0.5 g de leche en polvo, con el fin de evitar la interferencia de los compuestos fenólicos presentes en este tipo de muestras en la determinación de Ara h 1 o Ara h 2 [Alves, 2015-a].

- **Extracción de proteínas hidrosolubles del huevo:**

Para la extracción de ovomucoide se introducen 0.1 g de muestra (previamente triturada y homogeneizada) en tubos de microcentrífuga de 2 mL, se adiciona 1.0 mL de PBS (0.01 M, pH 7.4) y se homogeneiza la mezcla mediante agitación en vórtex durante 1 min. A continuación, la mezcla resultante se incuba durante 30 min a 60 °C bajo agitación continua (950 rpm). Finalmente, el extracto obtenido se clarifica mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 min a 4 °C.

- **Extracción del ADN genómico de origen vegetal:**

Para la extracción del ADN genómico de la avellana se usó un protocolo conjunto que emplea bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y el kit comercial *PowerPlant Pro DNA Isolation Kit* (MoBio, CA, USA). La extracción se realiza a partir de 100 mg de harina desgrasada. La muestra alimentaria se muele en un mortero con nitrógeno líquido y se homogeneiza en 1.0 mL de una disolución de CTAB al 2 % (v/v). A continuación, se añaden 3 µL de RNasa y se incuba la mezcla 30 min a 65 °C. Transcurrido este tiempo se añaden 0.8 mL de cloroformo y se agita manualmente. La mezcla se centrifuga 10 min a 13000 rpm, se recoge el sobrenadante (~ 800 µL) y, a partir de este punto, se sigue el protocolo descrito en el kit comercial para la extracción del ADN genómico de origen vegetal.

- **Extracción y/o aislamiento del ADN mitocondrial de origen animal:**

Para el análisis del ADN mitocondrial de caballo se emplearon 3 protocolos de extracción de ADN diferentes, basados en la extracción directa del ADN_t genómico (**Protocolo I**) empleando el kit comercial (G-SpinTM Total DNA extraction kit) o realizando el aislamiento previo de la fracción mitocondrial y la posterior extracción de su ADN_t genómico (**Protocolo II**) (G-SpinTM Total DNA extraction kit) o específica del ADN_t mitocondrial (**Protocolo III**) empleando el kit comercial para la extracción de plásmidos (Speedtools plasmid DNA purification kit). También se prepararon lisados mitocondriales a partir de muestras cárnicas, mediante el aislamiento de la fracción mitocondrial y su posterior lisis alcalina.

El aislamiento de la fracción mitocondrial presente en muestras cárnicas se llevó a cabo siguiendo el protocolo puesto a punto por el Grupo de Biotecnología de Plantas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM. Para ello, se emplean 3.0 g de

muestra cárnica, previamente fraccionada, se adicionan 15 mL de Disolución I y se homogeneiza la mezcla mediante trituración, empleando una trituradora convencional de uso doméstico. La solución resultante se centrifuga a 1000 g (4 °C, 5 min) para la eliminación de restos sólidos y el sobrenadante se centrifuga a 12000 g (4 °C, 10 min) para el aislamiento de la masa mitocondrial. El precipitado resultante se empleó directamente para la obtención de extractos de ADN o lisados mitocondriales.

- **Protocolo I:** para la extracción del ADN genómico total se pesan 25 mg de muestra cárnica en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, siguiendo a continuación, las especificaciones recomendadas por el kit comercial *G-spinTM Total DNA Extraction Kit*, empleando los reactivos y columnas de extracción del kit, realizando la elución en 50 µL de la disolución CE (suministrada en el kit comercial).

- **Protocolo II:** este protocolo está basado en el aislamiento previo de la fracción mitocondrial y empleo del kit *G-spinTM Total DNA Extraction Kit*. Para ello, tras el aislamiento de la fracción mitocondrial, a partir de 3.0 g de muestra, el precipitado resultante se resuspende en 200 µL de la solución CL (suministrada en el kit) siguiendo a continuación, las especificaciones del kit comercial *G-spinTM Total DNA Extraction Kit*, empleando los reactivos y columnas de extracción del kit y realizando la elución en 50 µL de la disolución CE (suministrada en el kit comercial).

- **Protocolo III:** este protocolo está basado en el aislamiento previo de la fracción mitocondrial y en la posterior extracción específica del ADN circular empleando un Kit comercial para la extracción de plásmidos (*Speedtools plasmid DNA purification kit*). Para ello, después del aislamiento de la fracción mitocondrial, a partir de 3.0 g de muestra, el precipitado resultante se resuspende en 800 µL de Disolución MLB, se transfiere a un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se adicionan 400 µL de solución SDS, para la lisis mitocondrial, y 800 µL de Disolución III fría. La disolución resultante se centrifuga a 13000 rpm (25 °C, 5 min) para la precipitación y eliminación del ADN no mitocondrial. El sobrenadante resultante se purifica empleando las columnas y reactivos de lavado del kit comercial *Speedtools plasmid DNA purification kit*, siguiendo las especificaciones recomendadas, eluyendo el extracto resultante en 50 µL de H₂O autoclavada.

○ **Lisados mitocondriales:** para la obtención de lisados mitocondriales tras el aislamiento previo de la fracción mitocondrial, a partir de 3.0 g de muestra, el precipitado mitocondrial resultante se resuspende en 200 μ L de Disolución MLB, adicionando posteriormente 100 μ L de solución SDS, para la lisis alcalina de las paredes mitocondriales.

La pureza de los extractos de ADN obtenidos se evaluó a partir de los valores de absorbancia a 260, 230 y 280 nm obtenidos con un NanoDrop ND-1000.

3.3.2. Protocolos de amplificación por PCR

En este apartado se describe la mezcla de amplificación y los programas de PCR empleados para la amplificación de los fragmentos específicos del gen que codifica la proteína alergénica *Cor a 9* o de la región *D-loop* del ADN mitocondrial de caballo.

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen total de 20 μ L, empleando una mezcla que contiene 10 μ L de DNA *AmpliTools Fast Master Mix 2x* (Biotools), 5 pmol de cada cebador (directo e inverso, Tabla 3.1), la cantidad deseada de extracto de ADN en un volumen total de 2 μ L y H₂O esterilizada.

Los programas empleados para la amplificación de las regiones de interés se resumen en la Tabla 3.2, que implican en todos los casos, además, una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C durante 4 o 5 min y una etapa de elongación final a 72 °C durante 6 o 5 min, para la amplificación de la región de interés de la avellana o del ADN mitocondrial de caballo, respectivamente.

Tabla 3.2. Descripción de los programas de PCR empleados.

Programa	Desnaturalización (94 °C), s	Hibridación, s	Elongación (72 °C), s	Número de ciclos
PCR convencional avellana	45	60 (65 °C)	60	35
PCR de tiempo reducido avellana	15	15 (65 °C)	30	30
PCR-caballo	15	30 (55 °C)	—	35

La calidad de los amplicones obtenidos se evaluó mediante electroforesis en gel (1.8 % de agarosa teñidos con bromuro de etidio), utilizando como marcador de tamaño un marcador en escalera de 100 bp (Biotools). Los productos de la amplificación resultantes, sin purificar, se almacenaron a -20 °C.

3.3.3. Preparación de inmunosensores para la determinación de marcadores proteicos

En este apartado se describen los protocolos empleados en la fabricación de plataformas inmunosensoras amperométricas, basadas en el empleo de MBs como μ -soportes sólidos para la construcción de inmunosensores tipo sándwich para la determinación individual o multiplexada de las proteínas alergénicas β -LG, α -LA, Ara h 1, Ara h 2 y OM, y la determinación de IgGs bovinas, ovinas y caprinas para la identificación de adulteraciones en leche.

3.3.3.1. Fabricación de inmunocaptadores

A continuación, se describe de forma general el protocolo empleado para la modificación de MBs, funcionalizadas con grupos carboxílicos, con anticuerpos específicos para la fabricación de inmunocaptadores magnéticos para la captura sensible y selectiva de marcadores proteicos.

Para la modificación de las MBs, se transfiere una alícuota de 3.0 μ L de la suspensión comercial de HOOC-MBs a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se realizan dos lavados con 50 μ L de disolución reguladora de MES 25 mM (pH 5.0), mediante incubación de las MBs durante 10 min (25 °C, 950 rpm). Cada etapa de lavado de las MBs requiere su re-suspensión en la disolución de lavado y la colocación del eppendorf que las contiene en un concentrador magnético, durante 3 min, con el fin de concentrar las MBs y eliminar el sobrenadante sin pérdida de las mismas. En primer lugar, se lleva a cabo la activación de los grupos carboxílicos de las MBs mediante su incubación con 25 μ L de la disolución mezcla de EDC/Sulfo-NHS 50 mg mL⁻¹

(preparada en MES 25 mM, pH 5.0) durante 35 min (25 °C, 950 rpm). A continuación, con ayuda del concentrador magnético, se retira la mezcla de activación y se realizan dos lavados con 50 µL de MES 25 mM (pH 5.0). Para la inmovilización covalente del anticuerpo de captura (AbC), las HOOC-MBs, previamente activadas, se incuban con 25 µL de la solución de AbC (preparada en MES 25 mM pH 5.0) (25 °C, 950 rpm) (concentraciones y tiempos de incubación específicos resumidos en la Tabla 3.3). Posteriormente, las MBs modificadas con el AbC se lavan 2 veces con 50 µL de MES. Los grupos carboxílicos activados residuales, tras la inmovilización del AbC, se bloquean mediante la incubación de las AbC-MBs con 25 µL de etanolamina 1 M (preparada en disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 8.0) durante 60 min (25 °C, 950 rpm). Las AbC-MBs resultantes se lavan una vez con 50 µL de disolución reguladora de Tris-HCl (0.1 M, pH 7.2) y dos veces con 50 µL de PBST (0.01 M, pH 7.5) (inmunocaptadores para β -LG y α -LA) o con la disolución bloqueante de caseína (inmunocaptadores para Ara h 1, Ara h 2, OM e IgGs). Las MBs modificadas resultantes pueden emplearse directamente para la determinación de la proteína diana o almacenarse en PBS (0.01 M, pH 7.5, filtrado) a 4 °C (tiempos de almacenamientos especificados en la Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Concentración del AbC y tiempo de incubación para la modificación de HOOC-MBs y estabilidad de almacenamiento de los inmunocaptadores resultantes (en PBS filtrado a 4 °C).

Inmunocaptadores	[AbC], µg mL ⁻¹	Tiempo de incubación, min	Estabilidad, días	Apartado en el que se describe su empleo
anti-β-LG	10	30	12	4.1.1
anti-α-LA	50	15	12	4.1.1
anti-Ara h 1	25	30	25	4.1.2 y 4.2.1
anti-Ara h 2*	50	15	50	4.1.2 y 4.2.1
anti-OM	50	15	63	4.1.3
anti-Bov	10	45	67	4.2.2
anti-Ovi	25	45	67	4.2.2
anti-Cap	50	45	67	4.2.2

*Anticuerpo de captura de Ara h 2: anti-Ara h 2(C).

3.3.3.2. Determinación individual de marcadores proteicos

En esta sección se detallan los protocolos empleados para la determinación individual de β -LG, α -LA, Ara h 1, Ara h 2, OM e IgGs bovinas, ovinas y caprinas, clasificados en función del empleo de anticuerpos secundarios conjugados directamente con peroxidasa (AbD-HRP) o de bioconjugados enzimáticos secundarios.

- **Inmunosensores basados en el empleo de anticuerpos secundarios conjugados con HRP:**

Para la captura y marcaje de cada proteína diana se emplean los inmunocaptadores magnéticos descritos en el apartado 3.3.3.1. Para ello, cada inmunocaptor específico se incuba, de forma secuencial (determinación de β -LG) o en una única etapa (determinación de α -LA, OM e IgGs bovinas, ovinas y caprinas), con 25 μ L de la proteína diana (o muestra) y cada anticuerpo de detección conjugado con HRP (preparados en PBST o solución bloqueante de caseína) durante 30 min (25 °C, 950 rpm). Posteriormente, las MBs modificadas se lavan dos veces con 50 μ L de PBST o disolución bloqueante de caseína (condiciones específicas resumidas en la Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Concentración o dilución del AbD-HRP, número de etapas y tiempos de incubación empleados para la formación de los inmunocomplejos tipo sándwich.

Inmunosensores	AbD-HRP	Número de etapas	Tiempo de incubación, min	Medio de incubación	Apartado en el que se describe su empleo
β -LG	0.75 μ g mL ⁻¹	2	30 + 30	PBST	4.1.1
α -LA	1.0 μ g mL ⁻¹	1	30	PBST	4.1.1
OM	Dil. 1/25	1	30	Solución bloqueante de caseína	4.1.3
IgG Bov	Dil. 1/1000	1	30	Solución bloqueante de caseína	4.2.2
IgG Ovi	Dil. 1/500	1	30	Solución bloqueante de caseína	4.2.2
IgG Cap	Dil. 1/1000	1	30	Solución bloqueante de caseína	4.2.2

- **Inmunosensores basados en el empleo de estreptavidina-HRP para la determinación de Ara h 1:**

Para la determinación individual de Ara h 1 los inmunocaptadores fabricados (anti-Ara h 1-MBs, apartado 3.3.3.1) se incuban con 25 µL de la proteína diana (o muestra) (preparada en disolución bloqueante de caseína) durante 45 min (25 °C, 950 rpm). Transcurrido este tiempo, se elimina el sobrenadante y se realizan dos lavados con 50 µL de disolución bloqueante de caseína y, a continuación, se incuban con 25 µL de la disolución del b-anti-Ara h 1 (dil. 1/10000 en disolución bloqueante de caseína) durante 45 min (25 °C, 950 rpm). Los inmunocomplejos tipo sándwich capturados sobre la superficie de las MBs se lavan dos veces con 50 µL de PBST y se incuban con 25 µL de Estrep-HRP (dil. 1/1000 en PBST) durante 30 min (25 °C, 950 rpm) para su marcaje enzimático. Finalmente, las MBs resultantes se lavan dos veces con 50 µL de PBST.

- **Inmunosensores basados en el empleo de fragmentos de anticuerpo secundario conjugados con HRP para la determinación de Ara h 2:**

Para la determinación individual de Ara h 2 los inmunocaptadores fabricados (anti-Ara h 2(C)-MBs, apartado 3.3.3.1) se incuban con 25 µL de la proteína diana (o muestra) suplementada con el anti-Ara h 2(D) (dil. 1/1000, preparados en disolución bloqueante de caseína) durante 45 min (25 °C, 950 rpm). A continuación, las MBs con los inmunocomplejos tipo sándwich capturados sobre su superficie se lavan dos veces con 50 µL de PBST y se incuban con 25 µL del F(ab')₂-HRP (dil. 1/10000 preparado en PBST) durante 30 min (25 °C 950 rpm). Finalmente, las MBs resultantes se lavan dos veces con 50 µL de PBST.

3.3.3.3. Determinación multiplexada de marcadores proteicos

En este apartado se recogen los protocolos empleados para la determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2, detección total de las principales proteínas alergénicas del cacahuete y multiplexada de IgGs bovinas, ovinas y caprinas.

Los procedimientos experimentales desarrollados en cada caso son los mismos que los descritos en el apartado 3.3.3.2, para la determinación individual de estos marcadores proteicos, con mínimas modificaciones. A continuación, se detallan específicamente las modificaciones para cada plataforma inmunosensora desarrollada (etapas de lavado de las MBs similares a las descritas).

- **Plataforma inmunosensora para la determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2:**

Para el desarrollo de la plataforma inmunosensora dual para la determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2 se empleó el protocolo de análisis desarrollado para la determinación individual de Ara h 1 (apartado 3.3.3.2). Brevemente, cada inmunocaptor específico (anti-Ara h 1-MBs o anti Ara h 2(C)-MBs) se incubaba de manera individual (en tubos de microcentrífuga independientes) con la proteína diana (o muestra) de interés (45 min, 25 °C, 950 rpm), llevándose a cabo posteriormente la formación de los inmunocomplejos tipo sándwich y su marcaje enzimático mediante su incubación secuencial con cada anticuerpo de detección (b-anti-Ara h 1 dil. 1/10000 o anti-Ara h 2(D) dil. 1/1000, durante 45 min, 25 °C, 950 rpm) y el trazador enzimático correspondiente (Estrep-HRP dil. 1/1000 o F(ab')₂-HRP dil. 1/10000, para la determinación de Ara h 1 y Ara h 2, respectivamente), durante 30 min, 25 °C, 950 rpm.

- **Detección total de las principales proteínas alergénicas del cacahuete:**

La determinación del contenido total de Ara h 1 y Ara h 2 sobre electrodos individuales se realiza mediante la mezcla, en tubos eppendorf de 1.5 mL, de lotes individuales de inmunocaptadores (anti-Ara h 1-MBs y anti-Ara h 2(C)-MBs) preparados de forma independiente (apartado 3.3.3.1). La mezcla resultante se incubaba secuencialmente con 25 µL de las proteínas dianas (o muestra) durante 45 min (25 °C, 950 rpm) y con 25 µL de una mezcla que contiene los dos anticuerpos de detección (b-anti-Ara h 1 dil. 1/10000 y anti-Ara h 2(D) dil. 1/1000, preparados en disolución bloqueante de caseína) durante 45 min (25 °C, 950 rpm). Finalmente, los inmunocomplejos formados sobre las MBs se incubaban con 25 µL de una disolución mezcla que contiene los trazadores enzimáticos (Estrep-HRP dil. 1/1000 y F(ab')₂-HRP dil. 1/10000, preparados en PBST) durante 30 min (25 °C 950 rpm).

- **Plataforma inmunosensora para la determinación del contenido total de IgGs en leche:**

Para la determinación del contenido total de IgGs en leche se emplea el mismo protocolo, descrito en el apartado 3.3.3.2, que para la determinación individual de IgGs, partiendo, en este caso, de 1.0 μ L de cada inmunocaptor. Para ello, cada inmunocaptor (1.0 μ L de anti-Bov-MBs, anti-Ovi-MBs y anti-Cap-MBs) se modifica de forma independiente con su proteína diana (o muestra) y cada anticuerpo de detección. Tras la formación de los inmunocomplejos tipo sándwich, las MBs resultantes se lavan dos veces con 50 μ L de solución bloqueante de caseína. Finalmente, los tres lotes de MBs resultantes se combinan (3.0 μ L totales de MBs) en un tubo eppendorf de 1.5 mL.

- **Plataforma inmunosensora multiplexada para la determinación de adulteraciones en leche:**

Para la determinación multiplexada de IgGs bovinas, ovinas, caprinas y totales se emplearon los mismos protocolos de análisis descritos en los apartados 3.3.3.2 y 3.3.3.3.

3.3.4. Preparación de biosensores para la determinación de marcadores genéticos

Para la determinación sensible y selectiva de ácidos nucleicos se han empleado MBs comerciales, funcionalizadas con estreptavidina (Estrep-MBs) o proteína G (ProtG-MBs), para el anclaje efectivo de secuencias biotiniladas sobre Estrep-MBs, debido a la gran afinidad biotina-estreptavidina, o del anticuerpo Ab^{ADN/ARN} aprovechando la unión selectiva del dominio Fc de inmunoglobulinas de mamíferos a la proteína G. A continuación, se detallan los protocolos desarrollados para la determinación de ácidos nucleicos en función del formato de ensayo empleado.

- **Formatos de hibridación competitivos:**

Este formato está basado en la competición de la secuencia diana y una secuencia sintética idéntica modificada (FITC-Target) por su unión a la sonda de captura de ARN inmovilizada sobre la superficie de las MBs. Para ello, se depositan 0.5 μ L de la suspensión comercial de Estrep-MBs en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se

realizan 2 lavados con 50 μL de B&W (pH 7.5), se re-suspenden en 25 μL de la disolución de b-ARNCp 0.0025 μM (24 o 40-mer, preparadas en B&W, pH 7.5) y se incuban durante 15 min (37 °C, 950 rpm) para la formación de los genocaptos (b-ARNCp-MBs). A continuación, se retira el sobrenadante y se realizan 2 lavados con 50 μL de disolución bloqueante de caseína. Por último, se lleva a cabo la competición mediante la re-suspensión de las b-ARNCp-MBs en 25 μL de una disolución mezcla que contiene la secuencia diana suplementada con el FITC-Target 0.0025 μM y el anti-FITC-HRP (dil. 1/500) (preparados en solución bloqueante de caseína) y se incuba la mezcla durante 120 min (37 °C, 950 rpm), lavando las MBs modificadas resultantes dos veces con 50 μL de disolución bloqueante de caseína.

- **Formato de hibridación tipo sándwich:**

Esta estrategia, empleada para el desarrollo de plataformas genosensoras para la determinación de los fragmentos característicos de la secuencia *Cor a 9* de la avellana y de la región *D-loop* del ADN mitocondrial de caballo, emplea Estrep-MBs y sondas de ADN de captura y de detección modificadas y complementarias a la secuencia diana de interés.

- **Plataforma genosensora para la determinación de la secuencia *Cor a 9* de la avellana:**

Para la modificación de las Estrep-MBs se depositan 5.0 μL de la suspensión comercial en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se realizan 2 lavados con 100 μL de B&W (pH 7.5), a continuación, se re-suspenden en 100 μL de la disolución de la sonda de captura biotinilada (b-Cp) de 0.1 μM (preparada en B&W, pH 7.5) y se incuban durante 15 min (37 °C, 950 rpm). Transcurrido este tiempo, se realizan 2 lavados con 100 μL de disolución bloqueante de caseína. Para la captura y marcaje enzimático del híbrido formado, las b-Cp-MBs resultantes se incuban con 100 μL de una disolución mezcla que contiene la secuencia diana suplementada con la sonda de detección biotinilada (b-Dp) 0.25 μM y el conjugado de Estrep-HRP 0.5 mU μL^{-1} (preparada en disolución bloqueante de caseína) durante 15 min (37 °C, 950 rpm). Finalmente, las MBs resultantes se lavan dos veces con 100 μL de solución bloqueante de caseína.

○ **Plataforma genosensora para la determinación del ADN mitocondrial de caballo:**

El protocolo empleado es similar al descrito para la avellana, con mínimas modificaciones, realizándose en este caso todas las etapas de lavado e incubación con 50 y 25 μL , respectivamente. La modificación de las Estrep-MBs se lleva a cabo con la b-ADNCp 0.1 μM durante 30 min (37 °C, 950 rpm), realizando la formación del híbrido tipo sándwich sobre la superficie de las MBs mediante la incubación de las b-ADNCp-MBs con la disolución mezcla de la secuencia diana suplementada con la sonda de detección modificada 0.25 μM (b- o FITC-ADNDp, preparadas en disolución bloqueante de caseína). Seguidamente, se realizan dos lavados con la disolución bloqueante de caseína y se incuban con Estrep-HRP (dil. 1/1000) o anti-FITC-HRP (dil. 1/5000), en función de la modificación de cada sonda de detección empleada, durante 30 min (37 °C, 950 rpm). Las MBs resultantes se lavan dos veces con la solución bloqueante de caseína.

● **Formatos de hibridación basado en el empleo de concatámeros:**

Esta estrategia está basada en un formato de hibridación tipo sándwich acoplado a estrategias de amplificación artificial de la longitud del híbrido formado de forma concatenada con secuencias de ADN lineales modificadas. Para ello, se lleva a cabo la amplificación artificial del híbrido de interés por hibridación en disolución, mediante la incubación de la secuencia diana con la sonda de detección/precursora 0.05 μM (ADNDp-Janus) y las secuencias de ADN lineales modificadas con FITC 0.1 μM (FITC-AP1 y FITC-AP2) (preparadas en Tris-HCl 0.1 M, pH 7.2) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las b-ADNCp-MBs (descritas en el desarrollo de formatos de hibridación tipo sándwich) se emplean para la captura de los concatámeros formados en disolución mediante su incubación con 25 μL de la mezcla anterior, durante 15 min (37 °C, 950 rpm). Posteriormente, se retira el sobrenadante y se realizan dos lavados con 50 μL de solución bloqueante de caseína. Las MBs modificadas resultantes se incuban con 25 μL de la disolución de anti-FITC-HRP (dil. 1/5000, preparada en disolución bloqueante de caseína) durante 15 min (37 °C, 950 rpm). Finalmente, las MBs resultantes se lavan dos veces con 50 μL de solución bloqueante de caseína.

- **Formatos basados en el empleo de un anticuerpo selectivo a heterohíbridos como bioreceptor de detección**

Este formato está basado en el empleo de Estrep-MBs para la captura de heterohíbridos de ADN/ARN y su posterior reconocimiento con un anticuerpo selectivo a este tipo de heterohíbridos ($Ab_{ADN-ARN}$), marcado enzimáticamente con un anticuerpo secundario modificado con la enzima HRP (anti-IgG-HRP) o una proteína bacteriana conjugada con una molécula de HRP (ProtA-HRP) o con un polímero que contiene 40 unidades de HRP (ProtA-poli-HRP40).

Para la modificación de las Estrep-MBs se depositan 5.0 μ L de la suspensión comercial en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, se realizan dos lavados con 50 μ L de B&W (pH 7.5), se re-suspenden en 25 μ L de disolución b-ARNCp 0.1 μ M (24 o 40 mer, preparadas en B&W, pH 7.5) y se incuban durante 60 min (37 °C, 950 rpm). Posteriormente, se retira el sobrenadante, y se realizan dos lavados con 50 μ L de disolución bloqueante de caseína. Los genocaptadores resultantes se re-suspenden en 25 μ L de la disolución de la secuencia diana (o muestra) (preparada en solución bloqueante de caseína) y se incuban durante 30 min (37 °C, 950 rpm) para su hibridación con las b-ARNCp-MBs. Transcurrido este tiempo, se retira el sobrenadante y se realizan dos lavados con 50 μ L de solución bloqueante de caseína. Para finalizar, se lleva a cabo el reconocimiento selectivo del heterohíbrido capturado con el $Ab_{ADN-ARN}$ y su marcaje enzimático en una misma etapa. Para ello, se incuban las MBs modificadas con 25 μ L de una disolución mezcla que contiene el $Ab_{ADN-ARN}$ (2.0 μ g mL⁻¹) y el marcaje enzimático correspondiente: anti-IgG-HRP (0.4 μ g mL⁻¹), ProtA-HRP (1.0 μ g mL⁻¹) o ProtA-poli-HRP40 (1.0 μ g mL⁻¹), preparadas en disolución bloqueante de caseína, durante 30 min (37 °C, 950 rpm). Finalmente se elimina el sobrenadante y se realizan 2 lavados con 50 μ L de disolución bloqueante de caseína.

- **Formatos basados en el empleo de un anticuerpo selectivo a heterohíbridos como bioreceptor de captura:**

Esta estrategia está basada en el empleo de ProtG-MBs para la inmovilización orientada del $Ab_{ADN-ARN}$ y la captura selectiva de los heterohíbridos formados previamente en disolución, y su posterior marcaje enzimático con Estrep-HRP [Torrente-Rodríguez, 2016-a].

La formación del heterohíbrido se lleva a cabo en disolución por hibridación homogénea mediante la incubación de la secuencia diana con la b-ARN Cp 0.05 μM (24 o 40 mer) en PBS (0.01 M, pH 7.5) durante 45 min (37 °C, 950 rpm).

Por otro lado, se depositan 2.5 μL de la suspensión comercial de ProtG-MBs en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, se realizan dos lavados consecutivos con 50 μL de PBS y, a continuación, se incuban con 25 μL de disolución Ab_{ADN-ARN} (2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, preparada en PBS) durante 45 min (37 °C, 950 rpm). Transcurrido este tiempo se realizan dos lavados con 50 μL de PBS. Las Ab_{ADN-ARN}-MBs resultantes se re-suspenden en 25 μL de disolución de formación del heterohíbrido (incubada previamente) y se incuban durante 45 min (37 °C, 950 rpm) para la captura de los heterohíbridos formados en disolución. Posteriormente, se realizan dos lavados con 50 μL de disolución bloqueante de caseína y se lleva a cabo el marcaje enzimático con 25 μL de disolución de Estrep-HRP (dil. 1/25000, preparada en solución bloqueante de caseína) durante 30 min (37 °C, 950 rpm). Los bioconjugados magnéticos resultantes se lavan dos veces con 50 μL de disolución bloqueante de caseína.

3.3.5. Biosensores enzimáticos y comestibles

En este apartado se detallan los protocolos empleados para el desarrollo de sensores o biosensores enzimáticos electroquímicos con actividad retardada, basados en el empleo de electrodos serigrafiados de carbono, grafito-Azul de Prusia (PB)-GOx o biosensores comestibles de glucosa modificados con recubrimientos temporales sensibles al pH.

En primer lugar, se detallan los protocolos empleados para la fabricación de electrodos serigrafiados, puestos a punto en el grupo de investigación dirigido por el Prof. Joseph Wang de la UCSD [Sempionatto, 2017], [Bandodkar, 2015]. Para ello, se diseñaron electrodos serigrafiados individuales o plataformas multisensoras formados por uno o cuatro electrodos de trabajo, respectivamente (de carbono o grafito-PB, $\varnothing = 3 \text{ mm}$), un contraelectrodo de carbono y un pseudoelectrodo de referencia de Ag/AgCl.

Las plantillas empleadas para la fabricación de electrodos serigrafiados se desarrollaron utilizando el software AutoCAD (Autodesk, San Rafael, CA) y se fabricaron en acero inoxidable por la empresa Metal Etch Services (San Marcos, CA). Para su fabricación se imprimen, de forma secuencial, distintas capas de tintas conductoras, en primer lugar, una capa de Ag/AgCl, como colector de corriente, seguida de capas de carbono o grafito-PB para los electrodos de trabajo y contraelectrodos, manteniendo las capas conductoras a 85 °C durante 20 min, tras cada etapa de impresión.

3.3.5.1. Preparación de electrodos serigrafiados de glucosa

A continuación se detalla el protocolo empleado para la modificación de electrodos serigrafiados de carbono o grafito-PB en la fabricación de biosensores enzimáticos de glucosa. Para ello, se depositan 3.0 μL de una mezcla preparada mezclando volúmenes iguales de una disolución de GOx (40 mg mL^{-1} suplementada con 10 mg mL^{-1} de BSA, preparada en PBS 0.1 M, pH 6.5) y una disolución de quitosano (0.5 % (p/v) preparada en ácido acético 0.1 M) sobre la superficie de cada electrodo de trabajo empleado. A continuación, se dejan secar los electrodos durante una noche, a 4 °C, antes de su uso.

3.3.5.2. Preparación de electrodos comestibles de glucosa

En este apartado se detalla el protocolo empleado para la fabricación de biosensores comestibles de glucosa a partir de la metodología desarrollada por el grupo de investigación dirigido por el Prof. Joseph Wang de la UCSD, basados en el empleo de carbono activo como base conductora, y aceite de oliva como aglutinante y alimentos o reactivos biocompatibles con actividad biocatalítica [Kim, 2017]. Para ello, se prepara una mezcla de 17 mg de GOx (227.553 U/g), 100 mg de carbono activo y 100 μL de aceite de oliva, homogenizándose manualmente con un mortero. La mezcla resultante se

empaqueta en tubos de plásticos ($\phi = 2.8$ mm, $l = 4$ cm), insertando parcialmente en un extremo un cable de acero inoxidable (como contacto eléctrico), empleando el extremo opuesto como superficie biosensora, tras ser pulida con papel encerado.

3.3.5.3. Modificación de sensores o biosensores enzimáticos con recubrimientos transitorios

Para la obtención de (bio)sensores con actividad retardada se llevó a cabo la modificación de la superficie del electrodo de trabajo (carbono, grafito-PB-GOx o biosensores comestibles de glucosa) con recubrimientos temporales sensibles al pH. Para ello, se deposita una sola capa (3.0 μ L de 2.0, 4.0, 8.0 o 16.0 % (p/v)) o capas consecutivas (3.0 μ L de 16.0 % (p/v)) de la solución polimérica precursora (polímeros Eudragit® L100 o E PO preparados en isopropanol o etanol, respectivamente). Después de cada modificación, el disolvente se evapora a temperatura ambiente.

3.3.6. Medidas electroquímicas

Es este apartado se describen los protocolos empleados para la obtención de las medidas electroquímicas empleando técnicas amperométricas y voltamperométricas.

3.3.6.1. Amperometría en disoluciones agitadas

La determinación de marcadores proteicos y/o genéticos para seguridad alimentaria a partir de las plataformas inmuno- y genosensoras desarrolladas en esta Tesis Doctoral, basadas en el empleo de MBs y entidades moleculares conjugadas con HRP para la construcción y marcaje enzimático de biosensores, se llevó a cabo empleando electrodos serigrafiados de carbono individuales (SPCE), duales (SPdCE) o para multiplexado (SPC4E) como transductores y amperometría en disoluciones agitadas como técnica electroquímica.

Previamente a la realización de la medida electroquímica, los electrodos serigrafiados empleados se colocan en una carcasa de teflón, de fabricación casera, provista con uno, dos o cuatro imanes de neodimio embutidos que se sitúan justo debajo de cada electrodo de trabajo de los SPCE, SPdCE o SPC4E, respectivamente (Fig. 3.2 y 3.3), en función de su aplicación, y aseguran la captura magnética (por simple deposición de la suspensión de MBs modificadas) de forma estable y reproducible de las MBs modificadas sobre la superficie de cada electrodo de trabajo durante la medida electroquímica. Para la realización de la medida amperométrica, el conjunto MBs-SP(d)C(4)E/carcasa se sumerge en una célula electroquímica que contiene 10 (detección individual y dual) o 20 mL (detección multiplexada) de la disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 6.0) suplementada con HQ 1.0 mM (preparada justo antes de llevar a cabo la medida electroquímica). La disolución se mantiene bajo agitación mecánica constante, aplicándose una diferencia de potencial de -200 mV (frente al electrodo de referencia de Ag/AgCl) y se espera hasta alcanzar la estabilización de la corriente de fondo. A continuación, se adicionan 50 (detección individual o dual) o 100 μ L (detección multiplexada) de una disolución de H₂O₂ 0.1 M hasta que se alcanza de nuevo el estado estacionario (\sim 100 s). Las señales amperométricas obtenidas, que corresponden a la diferencia entre el estado estacionario obtenido tras la adición del sustrato enzimático y la corriente de fondo antes de su adición, resultan proporcionales a la concentración del analito de interés.

Las concentraciones de H₂O₂ e HQ, el potencial de detección aplicado (-0.20 V vs. electrodo de referencia de Ag/AgCl) y el procedimiento de captura magnética de las MBs modificadas se optimizaron en trabajos anteriores realizados en el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral [Conzuelo, 2012-a], [Eguílaz, 2010], [Gamella, 2012].

El mecanismo de reducción enzimática de H₂O₂ mediado por HQ consiste en la reducción enzimática del H₂O₂ a H₂O por la forma reducida de la HRP (HRP (Red)) que, a continuación, se regenera en presencia del mediador redox HQ, generando benzoquinona (BQ) que se reduce electroquímicamente en la superficie del transductor produciendo una variación de corriente catódica [Ahammad, 2013], [Camacho, 2007] en función de la cantidad de enzima inmovilizada en los bioconjugados magnéticos capturados sobre la superficie del electrodo de trabajo.

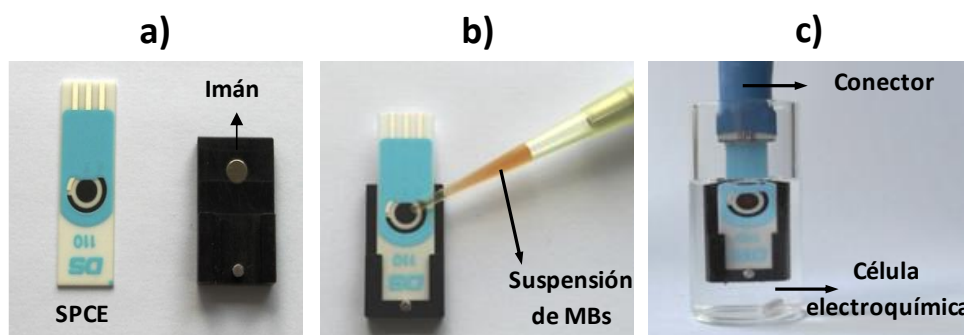


Fig. 3.3: (a) Electrodo serigrafiado de carbono (SPCE) y carcasa con imán de neodimio encapsulado de fabricación casera. (b) Captura magnética de las MBs modificadas sobre el electrodo de trabajo de un SPCE del conjunto SPCE/carcasa. (c) Conjunto MBs-SPCE/carcasa sumergido en la célula utilizada para las mediciones electroquímicas.

3.3.6.2. Cronoamperometría

Para la determinación de glucosa empleando biosensores enzimáticos se seleccionó como técnica electroquímica la cronoamperometría. La obtención de las curvas intensidad-tiempo se llevó a cabo en PBS (0.1 M pH 6.5 o 7.5), sangre entera, saliva, o fluidos gastrointestinales (pH 1.5–6.5), en ausencia y presencia de glucosa, aplicando un potencial de -0.2 (electrodo serigrafiado de grafito-PB-GOx) o +0.6 V (biosensor comestible de glucosa) (frente al electrodo de referencia de Ag/AgCl) durante 60 s a temperatura ambiente.

En la determinación de glucosa empleando biosensores comestibles de glucosa (en ausencia de mediadores redox) se produce la oxidación aeróbica de la glucosa a ácido glucónico, produciendo una variación de corriente anódica proporcional a la concentración de glucosa. En el caso del empleo de electrodos serigrafiados de grafito-PB-GOx, el mecanismo de oxidación enzimática de la glucosa mediado por PB consiste en la oxidación aeróbica enzimática de glucosa a ácido glucónico por la GOx, generando H_2O_2 , que se reduce electroquímicamente, catalizado selectivamente por el PB, en la superficie del transductor produciendo una variación de corriente catódica [Vázquez-González, 2007], [Karyakin, 1999].

3.3.6.3. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (CV) se seleccionó como técnica electroquímica para la caracterización de los procesos de activación o ensuciamiento de las superficies de los electrodos serigrafiados de carbono. Para la obtención de las curvas intensidad-potencial se depositó una alícuota de la disolución $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (mezcla de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 5 mM de cada especie, preparada en PBS 0.1 M, pH 6.5), realizando un barrido de -0.4 a +0.7 V (frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag/AgCl), a una velocidad de 100 mV s^{-1} , a temperatura ambiente.

3.3.7. Análisis de muestras reales

En este apartado se recogen las muestras alimentarias y clínicas empleadas en esta Tesis Doctoral para evaluar la aplicabilidad de las plataformas biosensoras electroquímicas desarrolladas, describiendo los protocolos empleados para su análisis y validación. Además, se describen los procedimientos empleados para la preparación de matrices alimentarias reales con niveles de traza de alérgenos o adulteradas, con el fin de evaluar la sensibilidad real de las plataformas biosensoras electroquímicas desarrolladas.

3.3.7.1. Determinación de marcadores proteicos en muestras de leche

A continuación, se recogen las muestras reales o preparadas que se han empleado para la evaluación de la aplicabilidad real de las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación de β -LG, α -LA o IgGs de vaca, oveja y cabra.

- **Muestras de leche empleadas:**

Leche cruda bovina, ovina, caprina, de búfala y materna, leche entera o semidesnatada pasteurizada bovina, leche UHT bovina (sin enriquecer o enriquecida con calcio), formulas infantiles en polvo e hidrolizadas y calostros ovinos y caprinos, adquiridas en supermercados o granjas locales o cedidas personalmente por mujeres en periodos de lactancia. Tras su recepción se almacenaron en alícuotas de pequeño volumen a -20 °C.

- **Preparación de muestras de leche pasteurizadas o adulteradas:**

Debido a la ausencia comercial de leche de oveja y cabra pasteurizada, estas se prepararon empleando el protocolo de pasteurización “flash” (HTST, High Temperature/Short Time, 72 °C/15 s) descrito por Korhonen y col. Para ello, se emplearon 50 µL de leche cruda incubadas a 72 °C durante 15 segundos [Korhonen, 2000].

Para la obtención de muestras de leches adulteradas a los niveles exigidos por la legislación, se prepararon muestras de leche cruda suplementadas (al 0.1, 0.5, 5.0, 10.0 o 20.0 % (v/v)) con leche cruda o calostro de la misma o de diferentes especies, respectivamente. Estas muestras se prepararon por diluciones seriadas y fueron homogeneizadas manualmente.

- **Determinación de β -LG, α -LA e IgGs bovinas, ovinas y caprinas con las plataformas inmunosensoras amperométricas desarrolladas:**

La determinación del contenido endógeno de β -LG, α -LA e IgGs se llevó a cabo por simple interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para las muestras analizadas, en los calibrados externos proporcionados por cada plataforma inmunosensora desarrollada. Para ello, se emplearon las muestras de leche o calostros sin diluir o diluidas (50000–250000) o (1000–2500000) veces en PBST (0.01 M, pH 7.5) o (100–100000) veces en la disolución bloqueante de caseína, para el análisis de β -LG, α -LA o IgGs (de vaca, oveja y cabra), respectivamente, siguiendo los protocolos descritos en los apartados 3.3.3.2 y 3.3.3.3.

- **Comparación con la metodología ELISA convencional:**

Los contenidos endógenos obtenidos para β -LG y α -LA empleando las plataformas inmunosensoras amperométricas desarrolladas fueron comparados con los proporcionados por kits ELISAs comerciales, basados en el empleo de los mismos inmunoreactivos (Bovine beta-Lactoglobulin ELISA Quantitation Set, E10-125, para β -LG y Bovine alpha-Lactalbumin ELISA Quantitation Set, E10-128, para α -LA, Bethyl Laboratories), siguiendo las especificaciones del fabricante, empleando muestras de leche sin diluir o diluidas (50000–250000) o (1000–250000) veces en PBST para el análisis de β -LG y α -LA, respectivamente.

3.3.7.2. Determinación de marcadores proteicos en extractos alimentarios

En este apartado se recogen las muestras empleadas para la determinación de las principales proteínas alergénicas del cacahuete (Ara h 1 y Ara h 2) y del huevo (OM) con las plataformas inmunosensoras amperométricas desarrolladas, además de los procedimientos de preparación de matrices alimentarias con niveles de traza de cacahuete o huevo, para la evaluación de la sensibilidad real de las metodologías desarrolladas.

- **Muestras empleadas:**

Se analizaron tanto muestras libres como con contenidos descritos de los alérgenos diana:

- Muestras de cacahuete: cacahuete frito y crudo, cacahuete recubierto de chocolate, barritas de chocolate o multicereales con cacahuete tostado, cremas de cacahuete, aceite de cacahuete, harina de cacahuete.

- Muestras de huevo: huevo liofilizado.

- Muestras libres de cacahuete o huevo: avellana, harina de trigo, sal y levadura.

Todas estas muestras se adquirieron en supermercados locales y se almacenaron de acuerdo con las indicaciones del proveedor.

- **Preparación de matrices alimentarias con niveles de traza de cacahuete o huevo:**

Para la obtención de muestras de harina o galletas contaminadas con cacahuete o huevo a niveles de traza, se suplementaron muestras de harina de trigo o galletas (libres de Ara h 1, Ara h 2 y OM) con la cantidad requerida de cacahuete frito, harina de cacahuete o huevo liofilizado, homogeneizándose las mezclas manualmente, obteniéndose secuencialmente mezclas homogéneas en el intervalo comprendido entre (1.0–10000.0) mg Kg⁻¹ de cacahuete frito o harina de cacahuete o entre (0.1–10.0) mg Kg⁻¹ de huevo liofilizado.

En la preparación de muestras de pan contaminadas con huevo, este se incorporó en forma liofilizada junto a los ingredientes necesarios en la elaboración de muestras de pan. Para ello se pesaron 500 g de harina de trigo, 8 g de sal, 25 g de levadura, la cantidad deseada de huevo liofilizado y se adicionaron 200 mL de agua. La mezcla resultante se homogeneizó manualmente mediante amasado durante 30 min, dejando reposar la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, la masa resultante se horneó durante 75 min a 95 °C.

- **Determinación de Ara h 1, Ara h 2 y OM con las plataformas inmunosensoras amperométricas desarrolladas:**

La determinación del contenido endógeno de Ara h 1, Ara h 2 y OM se llevó a cabo por interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas en los calibrados externos proporcionados por cada plataforma inmunosensora desarrollada. Para ello, en primer lugar, se realizó la extracción de las proteínas hidrosolubles del cacahuete o huevo empleando los protocolos de extracción específicos descritos en el apartado 3.3.1; los extractos alimentarios resultantes se emplearon directamente sin diluir o diluidos (50–1000), (1000–500000) o (5000–250000) veces en disolución bloqueante de caseína para la determinación individual o simultánea de Ara h 1, Ara h 2 u OM, respectivamente, siguiendo los protocolos descritos en los apartados 3.3.3.2 y 3.3.3.3.

- **Comparación y validación con la metodología ELISA convencional:**

Para la comparación y validación de los contenidos endógenos obtenidos empleando las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación individual o simultánea de Ara h 1 y Ara h 2, se emplearon los kits ELISAs individuales

para ambas proteínas alergénicas: Ara h 1 ELISA kit (EL-AH1) y Ara h 2 ELISA kit (EL-AH2) (suministrados comercialmente por Indoor Biotechnologies), basados en el empleo de los mismo inmunoreactivos. Estas determinaciones se realizaron siguiendo las especificaciones del fabricante y empleando los extractos alimentarios resultantes diluidos (50–1000) y (1000–500000) veces en PBST (0.01 M, pH 7.5, suplementado con BSA al 1.0 % (p/v)) para la determinación de Ara h 1 y Ara h 2, respectivamente.

3.3.7.3. Determinación de marcadores genéticos en extractos de ADN o lisados mitocondriales

A continuación, se detallan las muestras y protocolos empleados para la detección de la presencia de avellana o carne de caballo empleando las plataformas genosensoras amperométricas desarrolladas en esta Tesis Doctoral.

- **Muestras empleadas:**

Se analizaron muestras de origen vegetal: avellanas crudas de las variedades: Negreta, Tonda di Giffoni, Pauetet y San Giovanni; pistacho, anacardo, mandarina y nuez; suministradas por el grupo de Biotecnología de Plantas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid y por el Banco de Germoplasma del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA - Mas de Bover, Tarragona, Spain), y muestras de origen animal: carne de músculo de caballo, pollo, cerdo, pavo y ternera, adquiridas en supermercados locales y almacenadas a -80 °C.

- **Preparación de muestras cárnicas suplementadas con carne de caballo:**

Para la obtención de muestras de carne de ternera con diferentes cantidades de carne de caballo, en el intervalo comprendido entre (0.5–50.0) % (p/p), se prepararon mezclando las cantidades apropiadas de carne de ternera y caballo, completamente trituradas. Para la preparación de las mezclas al (0.5, 1.0, 2.5 y 5.0) % (p/p) de carne de caballo en ternera se empleó la mezcla al 10.0 % (p/p) de carne de caballo. Todas las muestras se trituraron y homogeneizaron con nitrógeno líquido.

- **Identificación de la presencia de avellana o carne de caballo con las plataformas genosensoras amperométricas desarrolladas:**

Las plataformas genosensoras desarrolladas en esta Tesis Doctoral se emplearon para la detección de los fragmentos característicos del gen *Cor a 9* de la avellana o de la región *D-loop* del ADN mitocondrial de caballo directamente en extractos de ADN (genómico o mitocondrial, 5–750 ng), lisados mitocondriales crudos (diluidos 2–25 veces) o en los productos de amplificación por PCR (diluidos 50 veces), preparados en disolución bloqueante de caseína, empleando formatos de ensayo tipo sándwich o basados en el empleo del AbADN/ARN como bioelemento de detección y el conjugado comercial ProtA-poli-HRP40, para la identificación de avellana o adulteración con carne de caballo, respectivamente. Los protocolos específicos empleados para la extracción o aislamiento y amplificación del material genético ya se han descrito en el apartado 3.3.1.

3.3.7.4. Análisis en fluidos biológicos o gastrointestinales sintéticos

En este apartado se recogen los fluidos biológicos y disoluciones simuladas de fluidos gástrico e intestinal empleados para asegurar la viabilidad de sensores o biosensores enzimáticos para la monitorización prolongada en el tiempo de glucosa en fluidos complejos y en la determinación de alérgenos de relevancia en saliva.

- **Muestras biológicas empleadas:**

Las muestras biológicas empleadas incluyeron: suero humano de varón tipo AB de plasma humano AB estéril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), sangre entera humana (Innovative Research) y saliva de individuos sanos obtenidas empleando el dispositivo de recolección Salivette® (Sarstedt). Para la recolección de saliva, en primer lugar, se llevó a cabo la incubación durante 1 min de la torunda en la boca del individuo, llevándose a cabo posteriormente su centrifugación (5000 rpm, 5 min). Las muestras biológicas se almacenaron a 4 °C.

- **Determinación de glucosa con biosensores enzimáticos:**

La determinación de glucosa empleando biosensores enzimáticos se llevó a cabo directamente en muestras de sangre entera, saliva, o fluidos gastrointestinales sin suplementar o suplementadas con estándares de glucosa, aplicando un potencial de -0.2 (electrodo serigrafiado de grafito-PB-GOx) o +0.6 V (biosensor comestible de glucosa) (frente al electrodo de referencia de Ag/AgCl) durante 60 s a temperatura ambiente.

- **Determinación de Ara h 1 en saliva con la plataforma inmunosensora amperométrica desarrollada:**

Para la evaluación del potencial alergénico del cacahuete se llevó a cabo la determinación de Ara h 1 en muestras de saliva, tomadas previamente y a determinados tiempos tras la ingesta de un sándwich preparado con dos cucharadas de crema de cacahuete. Las alícuotas de saliva recogidas se emplearon directamente sin diluir para el análisis de Ara h 1 con la plataforma inmunosensora desarrollada, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.3.2.

4.1. Plataformas inmunosensoras electroquímicas para proteínas alergénicas en alimentos

4.2. Plataformas inmunosensoras electroquímicas para la multideterminación de marcadores proteicos de alérgenos y fraudes alimentarios

4.3. Desarrollo de plataformas genosensoras electroquímicas para la determinación de marcadores genéticos de alérgenos y fraudes alimentarios

4.4. Desarrollo de biosensores enzimáticos basados en recubrimientos protectores poliméricos de disolución controlada

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se discuten los resultados más relevantes obtenidos en el desarrollo de plataformas electroquímicas para biosensado directo de analitos de relevancia alimentaria y clínica en muestras de elevada complejidad. Para lograrlo, se han seleccionado dos estrategias fundamentales: a) basadas en el empleo de micropartículas magnéticas (MBs) como soportes sólidos para la fabricación de biosensores de afinidad y b) basadas en formatos integrados modificados con recubrimientos poliméricos temporales.

Las MBs se han empleado como μ -soportes sólidos para la fabricación de inmuno- o genosensores amperométricos para la determinación individual o multiplexada de los principales alérgenos que afectan a la población infantil, presentes en la leche de vaca y huevo, y aquellos que generan las respuestas alérgicas más severas, como el cacahuete y avellana, además de alguna de las adulteraciones más significativas, como las de productos lácteos con leche o calostro del mismo o distinto origen animal, y la presencia de carne de caballo en muestras cárnicas.

Por otro lado, se han empleado formatos integrados modificados con polímeros biocompatibles comerciales sensibles al pH y de disolución controlada, que se depositan en la superficie del (bio)sensor protegiéndolo de procesos de adsorción indeseables o de desnaturalización de su componente biocatalítico durante su incubación en fluidos biológicos y/o complejos, o con valores de pH extremos.

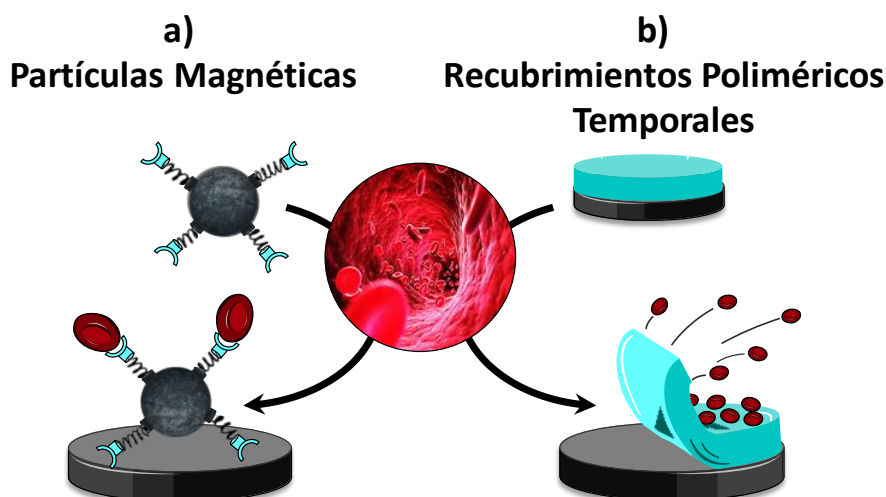


Fig. 4.1: Diagrama esquemático de las estrategias basadas en el empleo de MBs y recubrimientos poliméricos temporales para biosensado directo de analitos de relevancia alimentaria y clínica en muestras de elevada complejidad.

4.1. Plataformas inmunosensoras electroquímicas para proteínas alergénicas en alimentos

A continuación, se discuten los resultados obtenidos en el desarrollo de plataformas inmunosensoras amperométricas para la determinación individual de las principales proteínas alergénicas presentes en la leche (β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina), cacahuete (Ara h 1 y Ara h 2) y huevo (ovomucoide), basados en el empleo de MBs funcionalizadas con grupos carboxílicos (HOOC-MBs), para la fabricación de inmunosensores tipo sándwich, y SPCEs.

4.1.1. Determinación de β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina en leche

En este apartado se discuten los resultados más relevantes de los artículos: Ruiz-Valdepeñas Montiel *et al.* *Electrochemical magnetoimmunosensing platform for determination of the milk allergen β -Lactoglobulin*. *Talanta* 131 (2015) 156-162 y Ruiz-Valdepeñas Montiel *et al.* *Electrochemical magnetic beads-based immunosensing platform for the determination of α -lactalbumin in milk*. *Food Chem.* 213 (2016) 595-601, aportados como anexos al final de esta Tesis.

Con el fin de cumplir uno de los retos fijados en esta Tesis Doctoral, se seleccionó la leche por ser uno de los principales alimentos introducidos en nuestra dieta con mayor impacto en la población infantil en el desarrollo de alergias alimentarias, siendo la β -lactoglobulina (β -LG) y la α -lactoalbúmina (α -LA) las principales proteínas alergénicas presentes en la leche bovina. Resulta destacable también, la presencia endógena de α -LA en leche materna humana y como aporte nutritivo en fórmulas infantiles, debido a su elevado valor nutricional para los recién nacidos, siendo una fuente esencial de aminoácidos. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se han desarrollado dos plataformas inmunosensoras amperométricas para la determinación individual de β -LG y α -LA, basadas en formatos de inmunoensayo tipo sándwich, que emplean una pareja de anticuerpos específicos para cada proteína diana, sin modificar

(anti- β -LG o anti- α -LA) y conjugados con HRP (anti- β -LG-HRP o anti- α -LA-HRP) y HOOC-MBs como μ -soportes sólidos en la edificación del inmunosensor.

Los fundamentos de las plataformas inmunosensoras desarrolladas, que incluye la captura magnética de las MBs modificadas con los inmunocomplejos tipo sándwich sobre la superficie de los SPCEs y la transducción amperométrica en presencia del sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HQ}$, se muestran de forma esquemática en la Fig. 4.2. Brevemente, el anticuerpo de captura (anti- β -LG o anti- α -LA) se inmovilizó covalentemente en la superficie de las HOOC-MBs, activadas previamente con una disolución de EDC/Sulfo-NHS, bloqueándose posteriormente los grupos carboxílicos residuales activados con etanolamina (ET). Los inmunocaptadores magnéticos resultantes (anti- β -LG-MBs o anti- α -LA-MBs) se incubaron, de forma secuencial (determinación de β -LG) o en una única etapa (determinación de α -LA), con la proteína diana y el anticuerpo de detección (anti- β -LG-HRP o anti- α -LA-HRP) para el reconocimiento y marcaje enzimático de la proteína diana sobre las MBs. Las MBs modificadas con los inmunocomplejos tipo sándwich se capturaron magnéticamente sobre la superficie del electrodo de trabajo del SPCE tras su colocación en una carcasa de teflón provista con un imán de neodimio que se sitúa justo debajo del electrodo de trabajo. Los procesos de inmunoreconocimiento se monitorizaron mediante la variación de la corriente catódica obtenida por amperometría en disoluciones agitadas en presencia del sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HQ}$.

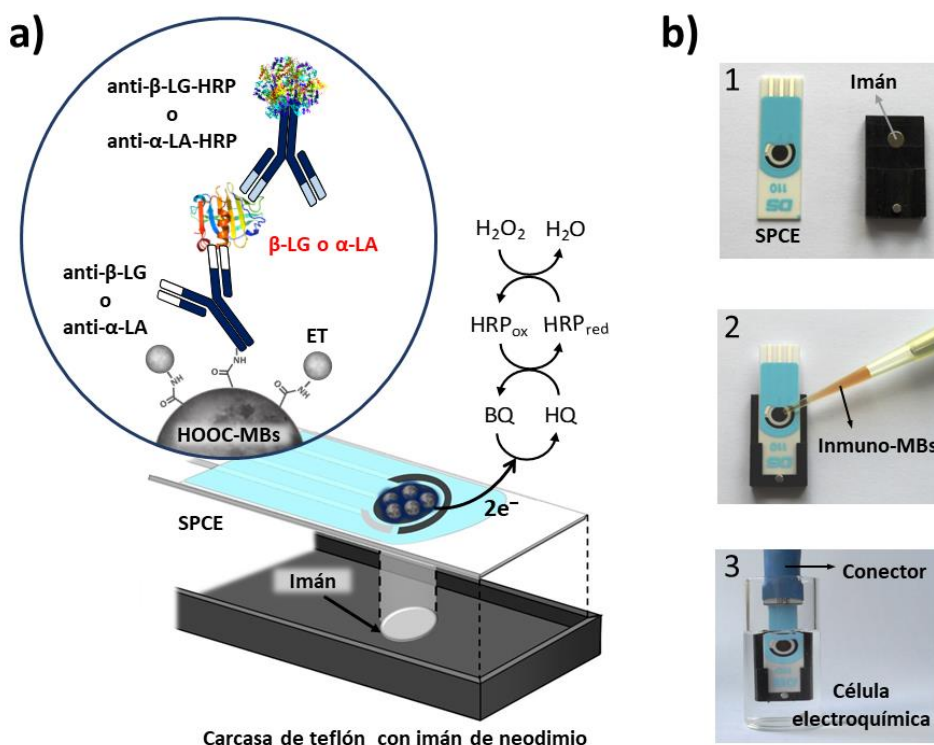


Fig. 4.2: a) Diagrama esquemático de los inmunosensores tipo sándwich desarrollados para la determinación individual de β -LG o α -LA y reacciones enzimáticas implicadas en la detección amperométrica de la reducción enzimática (HRP) del H_2O_2 mediada por la HQ. b) Determinación mediante amperometría en disoluciones agitadas: 1) carcasa de teflón con imán de neodimio y SPCE, 2) captura magnética de los inmunosensores sobre el electrodo de trabajo y 3) conjunto inmunosensor-SPCE-carcasa sumergido en la célula electroquímica.

4.1.1.1. Desarrollo de inmunosensores para la determinación individual de β -LG y α -LA

En primer lugar, se evaluó la viabilidad de desarrollar formatos de inmunoensayo tipo sándwich sobre μ -soportes magnéticos para la determinación de β -LG o α -LA. Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 50 o 10 ng mL⁻¹ de β -LG o α -LA, respectivamente, empleando MBs sin modificar o modificadas con cada anticuerpo de captura específico. Los resultados obtenidos demostraron la obtención de respuestas amperométricas 35 y 86 veces superiores en la detección de β -LG o α -LA cuando se empleaban anti- β -LG-MBs o anti- α -LA-MBs, respectivamente, en comparación con las obtenidas con MBs sin modificar. Estos

resultados confirman las bajas adsorciones inespecíficas, tanto de las proteínas diana como de los anticuerpos de detección conjugados con HRP, sobre la superficie de las MBs, y por tanto, el bloqueo eficiente de sus grupos carboxílicos activados residuales con etanolamina, así como la formación de inmunocomplejos tipo sándwich.

Una vez comprobada la viabilidad de las plataformas inmunosensoras desarrolladas, y con el fin de alcanzar las mejores prestaciones analíticas empleando protocolos sencillos y tiempos reducidos de ensayo, se optimizaron de forma sistemática las diferentes variables involucradas en su fabricación, considerándose como criterio para la selección de los valores óptimos para cada una de las variables estudiadas la mejor relación resultante (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B) y presencia de estándares de cada proteína diana (S).

A modo de ejemplo se muestran los estudios de optimización (Fig. 4.3) de la concentración de los anticuerpos de captura (anti- β -LG) y detección (anti- β -LG-HRP), realizados durante el desarrollo de la plataforma inmunosensora para la determinación de β -LG.

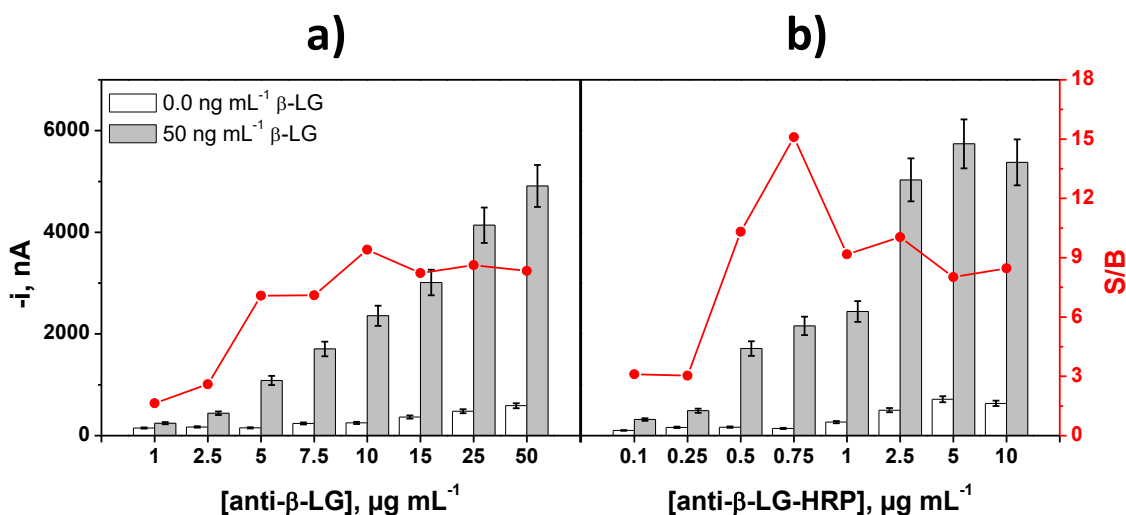


Fig. 4.3: Dependencia de los valores de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 50 ng mL^{-1} de estándares de β -LG (S, barras grises) preparados en PSBT (pH 7.5) y la relación de señales resultante (S/B, línea roja) con las concentraciones de anti- β -LG a) y anti- β -LG-HRP b). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados mostrados en la Fig. 4.3. demostraron el aumento de las respuestas amperométricas obtenidas con el incremento de la concentración de ambos anticuerpos

empleados para la captura y marcaje enzimático de la proteína diana, observándose a concentraciones superiores a 10 o 0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anti- β -LG o anti- β -LG-HRP, respectivamente, un incremento significativo de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de β -LG, y en ocasiones, una estabilización o reducción de las específicas, hechos que conllevan la disminución de la relación resultante (S/B). Estos resultados, fácilmente extrapolables a la implementación de otros inmunoensayos tipo sándwich, pueden justificarse teniendo en cuenta que el empleo de concentraciones elevadas de anticuerpo de captura y/o detección suelen favorecer el reconocimiento menos eficiente del analito diana, originando respuestas específicas estables o incluso inferiores (Fig. 4.3, b), la interacción entre ambos anticuerpos y el incremento de las adsorciones inespecíficas de los anticuerpos de detección conjugados con HRP sobre la superficie de las MBs. En vista de estos resultados, y con objeto de obtener la mayor sensibilidad, se seleccionaron valores de 10.0 y 0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anti- β -LG y anti- β -LG-HRP, respectivamente, como valores óptimos en la implementación de la plataforma inmunosensora para la determinación de β -LG.

Todas las variables estudiadas para las plataformas amperométricas desarrolladas para la determinación individual de β -LG y α -LA, así como los valores seleccionados como óptimos para cada una de ellas se recogen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Variables experimentales optimizadas, intervalos evaluados y valores seleccionados como óptimos en el desarrollo de plataformas inmunosensoras amperométricas para la determinación individual de β -LG y α -LA.

Variable experimental	Inmunosensor para β -LG		Inmunosensor para α -LA	
	Intervalo evaluado	Valor seleccionado	Intervalo evaluado	Valor seleccionado
$V_{\text{HOOC-MBs}}$, μL	2.0 – 10.0	3.0	–	3.0
[anti-(β -LG o α -LA)], $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.0 – 50.0	10.0	5.0 – 75.0	50.0
Tiempo de incubación del anti-(β -LG o α -LA), min	15 – 60	30	15 – 90	15
[anti-(β -LG o α -LA)-HRP], $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.1 – 10.0	0.75	0.5 – 5.0	1.0
Número de etapas	1 – 2	2	1 – 2	1
Tiempo de incubación de la proteína diana, min	15 – 120	30	15 – 100	30
Tiempo de incubación del anti-(β -LG o α -LA)-HRP, min	15 – 60	30		

*Otras variables involucradas en el proceso de detección amperométrica como las concentraciones de H_2O_2 e HQ y el potencial de detección a aplicar sobre SPCEs, de -0.20 V (vs. electrodo de referencia de Ag/AgCl) se optimizaron previamente en el Grupo de Investigación [Conzuelo, 2012-a], [Eguílaz, 2010], [Gamella, 2012].

Comparando los protocolos y tiempos de detección obtenidos para cada proteína diana, resulta destacable la posibilidad de llevar a cabo la determinación de α -LA en una única etapa de tan sólo 30 min. Es por ello que se muestran y comentan, brevemente, las optimizaciones de dichas variables evaluadas en la plataforma inmunosensora para la determinación de α -LA.

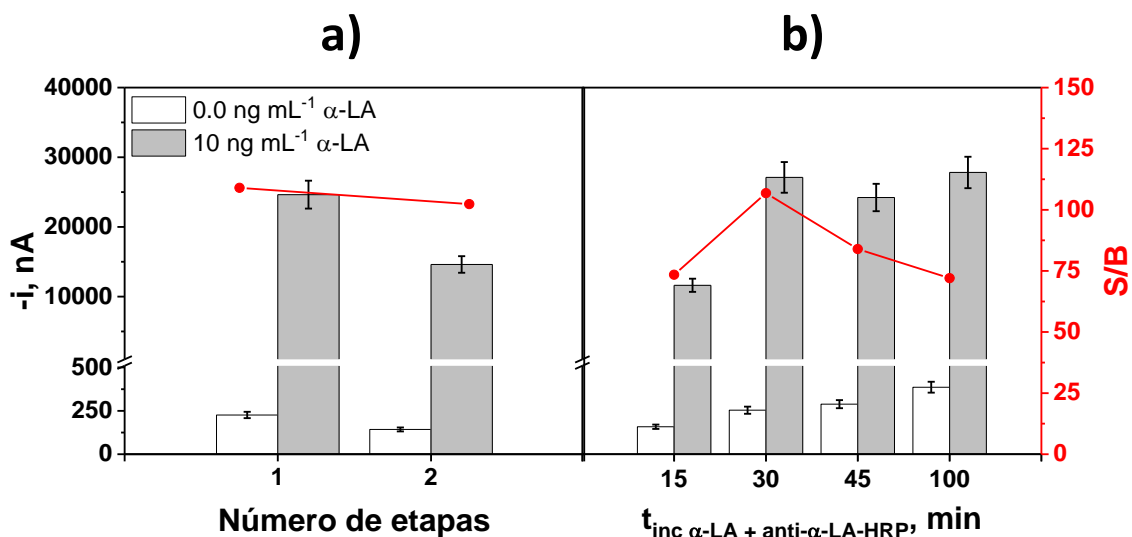


Fig. 4.4: Dependencia de los valores de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y presencia de estándares de 10 ng mL⁻¹ α -LA (S, barras grises) preparados en PSBT (pH 7.5) y la relación de señales resultante (S/B, línea roja) en la evaluación del número de etapas de incubación empleadas para la preparación de los inmunocomplejos tipo sándwich a) y del tiempo de incubación con la disolución del estándar de α -LA suplementada con anti- α -LA-HRP b). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

La evaluación del número de etapas implicadas en la detección de α -LA se llevó a cabo realizando la incubación de las anti- α -LA-MBs con la proteína diana y el anti- α -LA-HRP de forma secuencial, en 2 etapas de 30 min cada una, o en una única etapa de 30 min. Los resultados obtenidos (Fig. 4.4, a), demuestran que no existen diferencias significativas entre las relaciones resultantes (S/B) empleando 1 o 2 etapas, por lo que, por sencillez y reducción en el tiempo de ensayo, se decidió llevar a cabo la determinación de α -LA en una única etapa. Es importante destacar, además, que de acuerdo con los resultados mostrados en la Fig. 4.4 b), es posible realizar la determinación en tan solo 15 min con una pérdida de un 30 % de sensibilidad (en comparación con la óptima de 30 min) para 10 ng mL⁻¹ de estándares de α -LA, concentración 100000 veces inferior a la que se encuentra de forma endógena en leche de vaca sin procesar.

Trabajando en las condiciones experimentales optimizadas (resumidas en la Tabla 4.1) se caracterizó el comportamiento analítico de las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación individual de estándares de diferente concentración de β -LG o α -LA (preparados en PBST, pH 7.5), obteniéndose los amperogramas y las rectas de calibrado que se muestran en la Fig. 4.5.

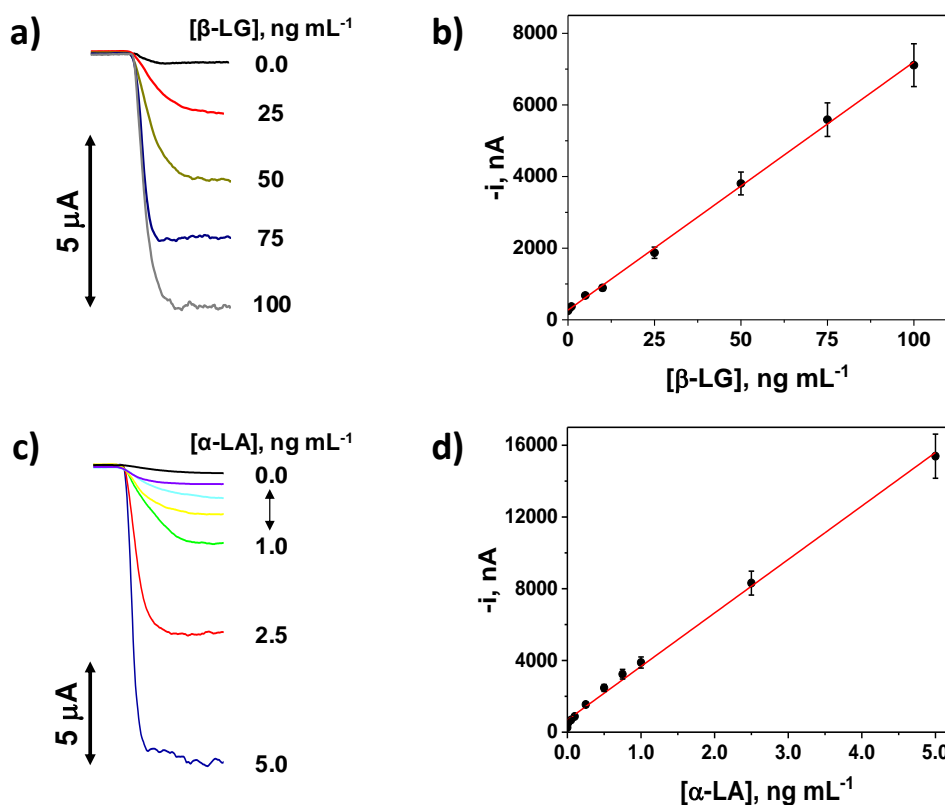


Fig. 4.5: Respuestas amperométricas reales obtenidas con las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación de estándares de β -LG a) o α -LA c) en las concentraciones indicadas y preparados en PBST, pH 7.5. Rectas de calibrado obtenidas para la determinación de estándares de β -LG b) o α -LA d). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Como se observa en la Fig. 4.5, existe una dependencia lineal de las respuestas amperométricas obtenidas con la concentración de β -LG (Fig 4.5, b) y α -LA (Fig 4.5, d) en los intervalos de concentración comprendidos entre 2.8 y 100 ng mL $^{-1}$ ($r = 0.999$) y 0.037 y 5.0 ng mL $^{-1}$ ($r = 0.999$) para las plataformas desarrolladas para la determinación de β -LG y α -LA, respectivamente. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) fueron estimados de acuerdo a los criterios $3 s_b/m$ y $10 s_b/m$, respectivamente, siendo “ s_b ” la desviación estándar de 10 señales amperométricas obtenidas en ausencia de proteína diana y “ m ” la pendiente del calibrado de cada plataforma inmunosensora evaluada. Todas las características analíticas obtenidas en la determinación de β -LG y α -LA se recogen en la Tabla 4.2.

Para la evaluación de las características operacionales se estudió, en primer lugar, la reproducibilidad en los procesos de fabricación y transducción electroquímica, comparando las respuestas amperométricas proporcionadas por inmunosensores

diferentes preparados de la misma manera, en un mismo día y en días diferentes, para estándares de 50 o 1.0 ng mL⁻¹ de β -LG o α -LA, respectivamente, obteniéndose los valores de desviación estándar relativa (RSD) recogidos en la Tabla 4.2 y que demuestran la robustez y fiabilidad de los protocolos empleados.

También se evaluó la estabilidad con el tiempo de los inmunocaptadores magnéticos (anti- β -LG-MBs o anti- α -LA-MBs) almacenados, tras su preparación, a 4 °C en una disolución de PBS (pH 7.5) filtrada. Para ello se controlaron los valores de la relación resultante (S/B) obtenidos a partir de las respuestas amperométricas proporcionadas cada día de control con inmunosensores fabricados a partir de los inmunocaptadores almacenados, en ausencia y presencia de 50 ng mL⁻¹ de estándares de β -LG o 1.0 ng mL⁻¹ de α -LA, respectivamente. Los resultados obtenidos (Fig. 4.6.) demuestran que los inmunoconjugados almacenados proporcionan respuestas reproducibles y sin pérdida significativa de sensibilidad durante al menos 12 días después de su preparación.

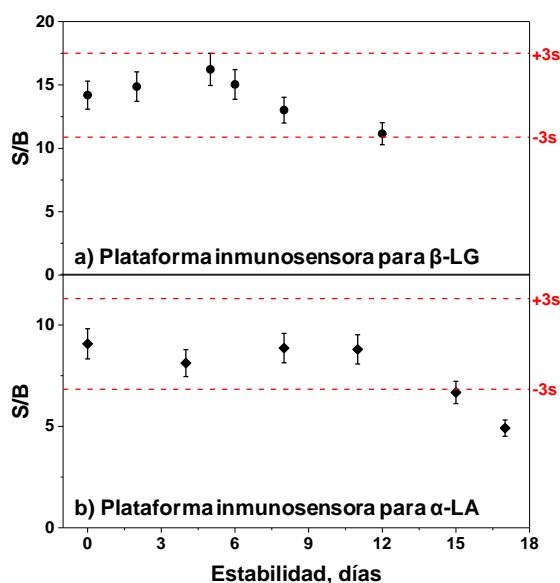


Fig. 4.6: Gráfico de control construido para el estudio de la estabilidad de los inmunocaptadores preparados para la determinación de β -LG a) y α -LA b) almacenadas en PBS filtrado a 4 °C. Relación resultante (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas con las inmunoplateformas preparadas a partir de ellos en ausencia (B) y presencia de 50 o 1.0 ng mL⁻¹ de estándares de β -LG o α -LA (S), respectivamente. Gráfico de control construido tomando como valor medio la relación S/B obtenida para 10 inmunosensores preparados el primer día de estudio (día de preparación de los inmunocaptadores) y como límites superior e inferior +3s y -3s de dicho valor medio, respectivamente, siendo “s” la desviación estándar que resulta para los 10 valores de S/B obtenidos. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n = 3)

Tabla 4.2. Características analíticas y operacionales obtenidas con las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación amperométrica de estándares de β -LG y α -LA.

	Inmunosensor para β -LG	Inmunosensor para α -LA
r	0.999	0.999
Pendiente, nA mL ng⁻¹	(69.3 \pm 0.8)	(297 \pm 4) \times 10
Ordenada en el origen, nA	(27 \pm 9) \times 10	(71 \pm 6) \times 10
Intervalo lineal, ng mL⁻¹	2.8 – 100.0	0.037 – 5.0
LD, ng mL⁻¹	0.8 (20 pg)	0.011 (0.28 pg)
LC, ng mL⁻¹	2.8 (70 pg)	0.037 (0.93 pg)
RSD_(n=10), %, mismo día	8.4	8.1
RSD, %, distintos días	9.1 (n=6)	9.7 (n=7)
Estabilidad, días	12	12

Los resultados mostrados en este apartado demuestran el desarrollo de dos plataformas inmunosensoras para la determinación individual de las principales proteínas alergénicas de la leche con características operacionales similares, obteniéndose mejores prestaciones analíticas en la determinación de α -LA, lo que se atribuye a la mayor afinidad de la pareja de anticuerpos seleccionada para la determinación de esta proteína.

Es importante destacar que este es el primer inmunosensor descrito en la literatura para la determinación de α -LA y que, aunque el desarrollado para β -LG ofrece un LD superior a otro electroquímico descrito previamente en la literatura para esta misma proteína (0.85 pg mL⁻¹ [Eissa, 2012]), las características analíticas que ofrecen ambas inmunoplateformas son suficientes y adecuadas para determinar, de forma fiable, el contenido endógeno de ambas proteínas en muestras de leche. En comparación con los kits ELISA comerciales, basados en el empleo de los mismos inmunoreactivos para la determinación individual de estas proteínas alergénicas de la leche, la simplicidad inherente de las plataformas electroquímicas desarrolladas, así como el empleo de instrumentación de bajo coste y fácilmente miniaturizable, las hace potencialmente atractivas para el desarrollo de herramientas portátiles para el análisis rutinario y en el punto de atención de productos lácteos.

4.1.1.2. Evaluación de la selectividad

Con el fin de aplicar las metodologías desarrolladas a la determinación de β -LG y α -LA en muestras reales, se evaluó la determinación de las proteínas dianas en presencia de otras proteínas presentes en la leche (BSA, caseína, fosfatasa alcalina, catalasa y lactoperoxidasa (LPO)), ácido ascórbico y lisozima. Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 y 50 ng mL⁻¹ de β -LG o 0.0 y 1.0 ng mL⁻¹ de α -LA, preparados en ausencia o presencia de cada interferente en la concentración en la que se encuentran habitualmente en las muestras de leche o la resultante tras aplicar la dilución requerida para el análisis de las proteínas diana.

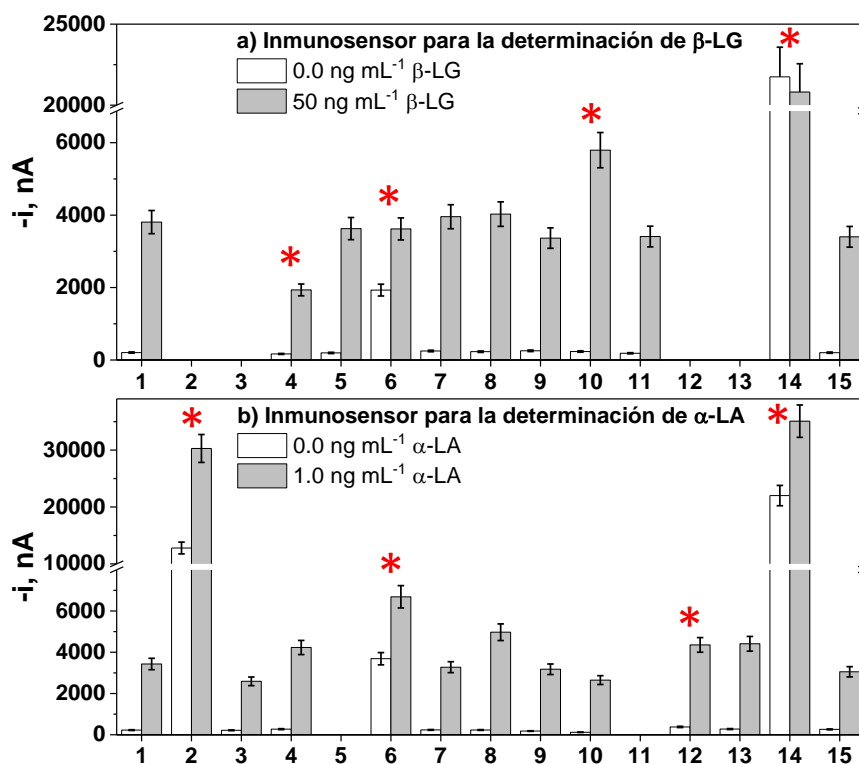


Fig. 4.7: Respuestas amperométricas obtenidas con las plataformas inmunosensoras para β -LG a) y α -LA b) para estándares de 0.0 y 50 ng mL⁻¹ β -LG a) o 1.0 ng mL⁻¹ α -LA b) preparados en PSBT (pH 7.5) en ausencia (1) o en presencia de 3.0 mg mL⁻¹ (2) o 60 ng mL⁻¹ de β -LG (3), 400 μ g mL⁻¹ (4) u 8.0 ng mL⁻¹ de BSA (5), 28 mg mL⁻¹ (6) o 560–600 ng mL⁻¹ de caseína (7), 0.5 U L⁻¹ de fosfatasa alcalina (8), 5.0 μ g mL⁻¹ de catalasa (9), 20 μ g mL⁻¹ (10) o 0.4 ng mL⁻¹ de ácido ascórbico (11), 2.0 μ g mL⁻¹ (12) o 40 pg mL⁻¹ de lisozima (13) y 2.0 mg mL⁻¹ (14), 40 (15 a) u 8.0 (15 b) ng mL⁻¹ de LPO. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$). Interferencias significativas marcadas con (*).

Los resultados obtenidos demuestran la existencia de reactividad cruzada entre las proteínas β -LG y α -LA (Fig. 4.7 b), barra 2) y para las dos proteínas diana en presencia de caseína (Fig. 4.7, barra 6) y lisozima (Fig. 4.7 b), barra 12). Cabe destacar, además, que la presencia de BSA producía una disminución notable en las intensidades de corriente medidas con la inmunoplateforma desarrollada para la determinación de β -LG (Fig. 4.7 a), barra 4), debido, posiblemente, a un bloqueo parcial de la superficie activa de los inmunocaptadores magnéticos, y que la LPO interfería de forma significativa en ambas plataformas inmunosensoras (Fig. 4.7, barra 14) debido a su adsorción no específica sobre la superficie de las MBs y al sistema de detección empleado, puesto que la enzima LPO cataliza la reducción de H_2O_2 de manera similar a la HRP [Conzuelo, 2014-a].

Con el fin de asegurar la aplicabilidad de las plataformas inmunosensoras para la determinación fiable del contenido de las proteínas diana, se evaluó la influencia de las proteínas, que interferían significativamente, en las concentraciones resultantes tras ser diluidas 250000 o 50000 veces (dilución de trabajo seleccionada para el análisis de muestras de leche cruda o UHT, respectivamente) observando la desaparición de interferencia para todas ellas en estas condiciones (Fig. 4.7, barras: 3 b), 5 a), 7, 11 a), 13 b) y 15).

Evalutando de forma conjunta los resultados obtenidos en el estudio de interferentes para las plataformas inmunosensoras desarrolladas, podemos concluir que la similitud de estructura de las proteínas séricas que conforman la leche favorece la existencia de reactividad cruzada entre ellas cuando se encuentran a elevadas concentraciones. Dichas interferencias sólo pueden evitarse mediante el aislamiento de la proteína de interés o desfavoreciendo el reconocimiento inmunológico inespecífico de proteínas no diana mediante la reducción de su concentración en la muestra. En este sentido, los bajos LDs que ofrecen las plataformas inmunosensoras desarrolladas, de 0.8 y 0.011 ng mL⁻¹ para la determinación de β -LG y α -LA, respectivamente, entre 7 a 8 órdenes de magnitud inferiores a los contenidos encontrados en muestras de leche sin procesar, permiten trabajar con elevadas diluciones de la muestra, garantizando en estas condiciones la minimización de las interferencias de las proteínas no diana y la aplicabilidad práctica de las plataformas desarrolladas.

4.1.1.3. Determinación de β -LG en muestras de leche

Tras evaluar su selectividad, la plataforma inmunosensora se aplicó a la determinación del contenido endógeno de β -LG en diferentes muestras de leche de vaca cruda, semidesnatada pasteurizada y entera UHT (sin enriquecer y enriquecidas con calcio) adquiridas en un supermercado local, y en muestras de leche materna, empleando el protocolo descrito en el apartado 3.3.7.1.

En primer lugar, se evaluó la posible existencia de efecto matriz en cada una de las muestras analizadas. Los resultados obtenidos demostraron que no existían diferencias significativas entre las pendientes de las curvas de calibrado construidas en ausencia o presencia de las muestras de leche, adecuadamente diluidas (dil. 1/2500 – 1/250000 en PBST (pH 7.5)) y suplementadas con estándares de β -LG. Teniendo en cuenta estos resultados, la determinación del contenido endógeno de β -LG en cada una de las muestras se realizó por interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas, para las muestras diluidas, en el calibrado construido con disoluciones estándares (Fig. 4.5). Los resultados obtenidos con el inmunosensor amperométrico desarrollado, así como los proporcionados por un kit ELISA espectrofotométrico comercial, basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos, se recogen en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Contenido endógeno de β -LG determinado en muestras de leche de vaca cruda, pasteurizada y UHT y leche materna analizadas con la plataforma inmunosensora amperométrica desarrollada y con un kit ELISA espectrofotométrico comercial basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos.

Muestras analizadas	Factor de dilución	Plataforma inmunosensora	ELISA
		$[\beta\text{-LG}], \mu\text{g mL}^{-1}$	$[\beta\text{-LG}], \mu\text{g mL}^{-1}$
Leche de vaca entera UHT	50000	$(8.7 \pm 0.7) \times 10^2$ RSD _(n=3) = 3.0 %	$(9 \pm 1) \times 10^2$ RSD _(n=3) = 4.7 %
Leche de vaca entera UHT (enriquecida con Ca^{2+})	50000	$(9.3 \pm 0.3) \times 10^2$ RSD _(n=3) = 1.4 %	$(9.3 \pm 0.8) \times 10^2$ RSD _(n=3) = 3.6 %
Leche de vaca semidesnatada pasteurizada	100000	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^3$ RSD _(n=3) = 6.8 %	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^3$ RSD _(n=3) = 1.9 %
Leche de vaca cruda	250000	$(3.8 \pm 0.3) \times 10^3$ RSD _(n=3) = 3.5 %	$(3.70 \pm 0.05) \times 10^3$ RSD _(n=3) = 0.6 %
Leche materna	—	< LD	< LD

Cabe destacar que los contenidos de β -LG obtenidos están de acuerdo con los valores descritos en la literatura para la leche cruda de vaca ($3\text{--}4 \text{ g L}^{-1}$ [Monaci, 2006], $2\text{--}4 \text{ g L}^{-1}$ [Farrell, 2004]) y con la ausencia de dicha proteína en leche materna. En el caso de las muestras de leches procesadas, aunque la ausencia de referencias de su contenido en la literatura impide contrastar los resultados obtenidos, puede observarse como el contenido de β -LG en las mismas es inferior al de la leche fresca, debido a que los tratamientos térmicos producen cambios en la estructura nativa de β -LG que se vuelven irreversibles a temperaturas superiores a 80°C [Casal, 1998], alterando el reconocimiento de la proteína diana por los anticuerpos de captura y detección empleados como base de la inmunoplateforma desarrollada.

La correlación entre los resultados obtenidos con la inmunoplateforma desarrollada y los proporcionados empleando el kit ELISA espectrofotométrico se muestra en la Fig. 4.8.

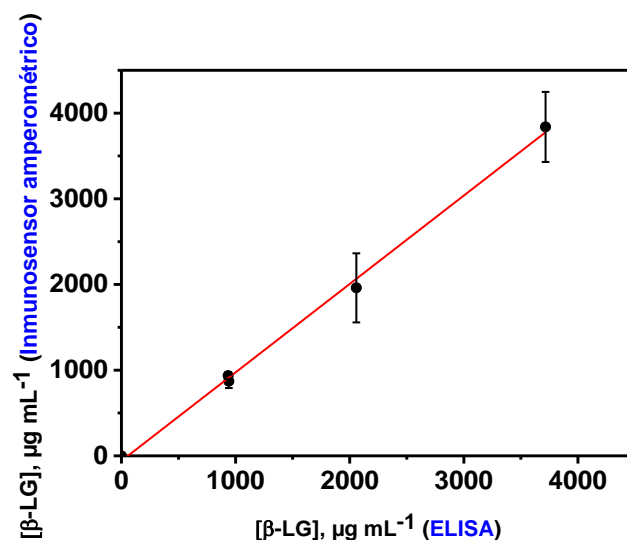


Fig. 4.8: Correlación entre los valores de concentración de β -LG obtenidos para las muestras indicadas en la Tabla 4.3 con la plataforma inmunosensora amperométrica desarrollada y un kit ELISA comercial basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$)

En la correlación de los valores obtenidos resultó una regresión lineal ($r = 0.998$) de pendiente (1.03 ± 0.03) y ordenada en el origen (-58 ± 72). Puesto que los intervalos obtenidos para la pendiente y ordenada en el origen incluyen el 1 y el 0, respectivamente, se puede concluir que no existen errores sistemáticos en la metodología desarrollada, por lo que puede utilizarse para la determinación fiable de β -LG en muestras de leche.

Una comparación más exhaustiva de las metodologías correlacionadas permite concluir que, además de proporcionar un LD 10 veces inferior (20 vs. 195 pg de β -LG) al del kit ELISA comercial, la metodología desarrollada es considerablemente más rápida, ya que proporciona resultados en, aproximadamente, 60 min (una vez preparados los inmunocaptadores magnéticos) frente a las 4 h requeridas por el kit comercial. Además, el empleo de menores volúmenes de incubación (25 vs. 100 μ L) permite realizar, con la misma cantidad de inmunoreactivos, un número de ensayos 4 veces superior con las inmunoplateformas que con el kit ELISA comercial (4000 determinaciones frente a las 1000 posibles con los inmunoreactivos que se suministran en un kit comercial).

4.1.1.4. Determinación de α -LA en muestras de leche

De forma similar a lo comentado en el apartado 4.1.1.3 la plataforma desarrollada para la determinación de α -LA se aplicó al análisis de diferentes muestras de leche de vaca (cruda y entera UHT), leche materna y fórmulas infantiles de uso común o libres de alérgenos como son las fórmulas hidrolizadas.

En primer lugar, se evaluó la influencia de la matriz de la muestra en la determinación de α -LA de modo similar a lo comentado para β -LG. La comparación estadística de los valores de las pendientes obtenidas demostró la ausencia de efecto matriz en todas las muestras analizadas previamente diluidas, por lo que la determinación de α -LA se llevó a cabo por interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas en el calibrado externo construido con estándares.

El protocolo empleado en el análisis de α -LA en muestras reales de leche, descrito en el apartado 3.3.7.1, se aplicó trabajando con diluciones de la muestra comprendidas entre 20000 y 2500000 veces en PBST (pH 7.5) con el fin de ajustar los contenidos endógenos al intervalo lineal de la plataforma desarrollada. Los valores obtenidos, así como su comparación con los proporcionados empleando un kit ELISA espectrofotométrico comercial, basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos, se resumen en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Contenido endógeno de α -LA encontrado en muestras de leche de vaca cruda, entera UHT, leche materna y fórmulas infantiles con la plataforma inmunosensora amperométrica desarrollada para la determinación de α -LA y con un kit ELISA espectrofotométrico comercial basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos.

Muestras analizadas	Plataforma inmunosensora		ELISA	
	Factor de dilución	$[\alpha\text{-LA}]$, mg mL ⁻¹	Factor de dilución	$[\alpha\text{-LA}]$, mg mL ⁻¹
Leche de vaca cruda	2500000	(1.1 \pm 0.1) RSD _(n=3) = 4.2 %	250000	(1.12 \pm 0.03) RSD _(n=3) = 1.0 %
Leche entera UHT	1000000	(0.52 \pm 0.07) RSD _(n=3) = 7.0 %	100000	(0.56 \pm 0.04) RSD _(n=3) = 3.9 %
Leche en polvo Almirón	1000000	(0.33 \pm 0.04) RSD _(n=3) = 6.5 %	100000	(0.32 \pm 0.02) RSD _(n=3) = 3.4 %
Leche en polvo Normolact	1000000	(0.21 \pm 0.01) RSD _(n=3) = 3.0 %	100000	(0.177 \pm 0.007) RSD _(n=3) = 2.1 %
Leche en polvo hidrolizada	1000	<LD	1000	<LD
Leche materna	20000	(0.55 \pm 0.08) $\times 10^{-3}$ RSD _(n=3) = 8.0 %	2000	(0.6 \pm 0.1) $\times 10^{-3}$ RSD _(n=3) = 9.1 %

Los valores endógenos de α -LA obtenidos para leche cruda y UHT de vaca están de acuerdo con los descritos en la literatura [Kamau, 2010], [Jeanson, 1999] y al igual que ocurría con la proteína β -LG, los valores de concentración encontrados en muestras procesadas son inferiores a los de la leche cruda por la desnaturalización de la estructura nativa de α -LA que ocurre durante la aplicación de tratamientos térmicos, y que modifica tanto las regiones específicas de inmunoreconocimiento como su potencial alergénico. Esto se confirma con los valores de concentración inferiores de α -LA encontrados en fórmulas infantiles, en comparación con leche UHT, demostrándose cómo tratamientos más agresivos, o incluso la sucesión de tratamientos térmicos, como los aplicados en la elaboración de fórmulas infantiles, conllevan a la desnaturalización progresiva de esta proteína. Estos resultados demuestran el potencial de esta proteína como biomarcador emergente para la identificación del tipo/severidad del procesado alimentario empleado [Jeanson, 1999].

Es importante destacar que, como era de esperar, el contenido de α -LA en leche materna y fórmulas infantiles hidrolizadas es casi indetectable con la plataforma inmunosensora implementada debido al empleo de una pareja de anticuerpos específicos

para la proteína α -LA bovina, la cual sólo presenta un 74 % de homología con la proteína humana [Indyk, 2009], y al tratamiento térmico aplicado a las fórmulas hidrolizadas, que supone la fragmentación de las proteínas que la conforman, eliminando así el riesgo de desencadenar reacciones alérgicas e intolerancias.

La correlación llevada a cabo en la comparación y validación de los resultados obtenidos con los proporcionados por un kit ELISA comercial (Tabla 4.4) que emplea los mismos inmunoreactivos, se muestra en la Fig. 4.9.

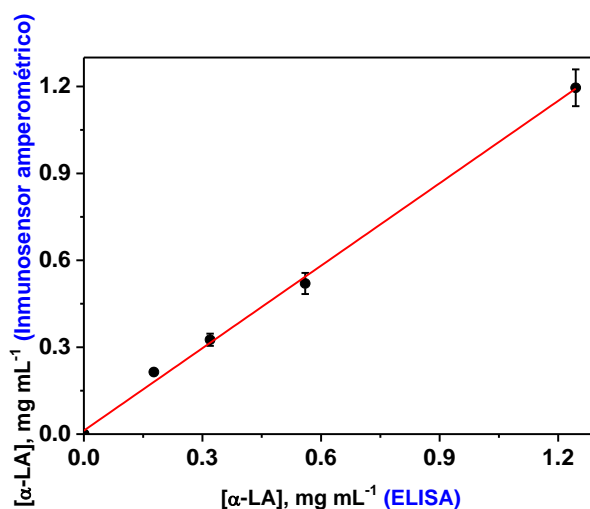


Fig. 4.9: Correlación obtenida entre los valores de concentración de α -LA proporcionados por la plataforma inmunosensora amperométrica desarrollada y un kit ELISA comercial, para las muestras indicadas en la Tabla 4.4. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$)

De nuevo resultó una buena correlación ($r = 0.9983$) con valores de pendiente (1.00 ± 0.03) y ordenada en el origen de (0.01 ± 0.02), que incluyen el 1 y el 0, respectivamente, confirmando que no existen errores sistemáticos y que la plataforma inmunosensora resulta apropiada para la determinación fiable de α -LA en muestras de leche y fórmulas infantiles.

Los resultados obtenidos demuestran el desarrollo de plataformas inmunosensoras basadas en el empleo de μ -soportes magnéticos y transducción amperométrica sobre electrodos desechables, que permiten la determinación individual y fiable de las principales proteínas alergénicas presentes en la leche, y que resultan competitivas frente a las metodologías empleadas comúnmente para su determinación, basadas en el empleo de kit ELISA comerciales, fundamentalmente en términos de sencillez, tiempo

de ensayo, compatibilidad con multiplexado, empleo de instrumentación de bajo coste y fácilmente automatizable, lo que las hace herramientas especialmente atractivas para su aplicación de forma rutinaria y en el punto de atención en cualquier etapa de la obtención, procesamiento y comercialización de productos lácteos.

4.1.2. Detección de cacahuete mediante la determinación de Ara h 1 y Ara h 2

En este apartado se discuten los resultados más relevantes de los artículos: Ruiz-Valdepeñas Montiel *et al.* *Sensitive and selective magnetoimmunosensing platform for determination of the food allergen Ara h 1. Anal. Chim. Acta* 880 (2015) 52-59 y Ruiz-Valdepeñas Montiel *et al.* *Electrochemical detection of peanuts at trace levels in foods using a magnetoimmunosensor for the allergenic protein Ara h 2. Sens. Actuators B-Chem.* 236 (2016) 825-833, aportados como anexos al final de esta Tesis.

Continuando con el análisis de los principales alérgenos alimentarios, hemos seleccionado el cacahuete como uno de los frutos secos asociado con reacciones alérgicas más graves, incluyendo el shock anafiláctico. La alergia al cacahuete afecta alrededor del 1 % de la población mundial, persistiendo en el 80 % de los individuos sensibilizados [Peng, 2013]. A día de hoy se han descrito 13 alérgenos del cacahuete (Ara h 1–13), considerándose las proteínas Ara h 1 y Ara h 2 los más relevantes [Koppelman, 2001]. Por este motivo se seleccionaron como dianas para el desarrollo de plataformas inmunosensoras amperométricas, capaces de detectar la presencia de este fruto seco a través de su determinación individual o dual.

Las plataformas desarrolladas están basadas en la formación de inmunocomplejos tipo sándwich sobre MBs y en el empleo de SPCEs. Los fundamentos de los protocolos empleados para la extracción de proteínas en matrices alimentarias sólidas y de la fabricación de los inmunosensores tipo sándwich desarrollados, así como su captura magnética sobre la superficie del electrodo de trabajo del SPCE para la transducción amperométrica en presencia del sistema H_2O_2/HQ , se muestran de forma esquemática en la Fig. 4.10.

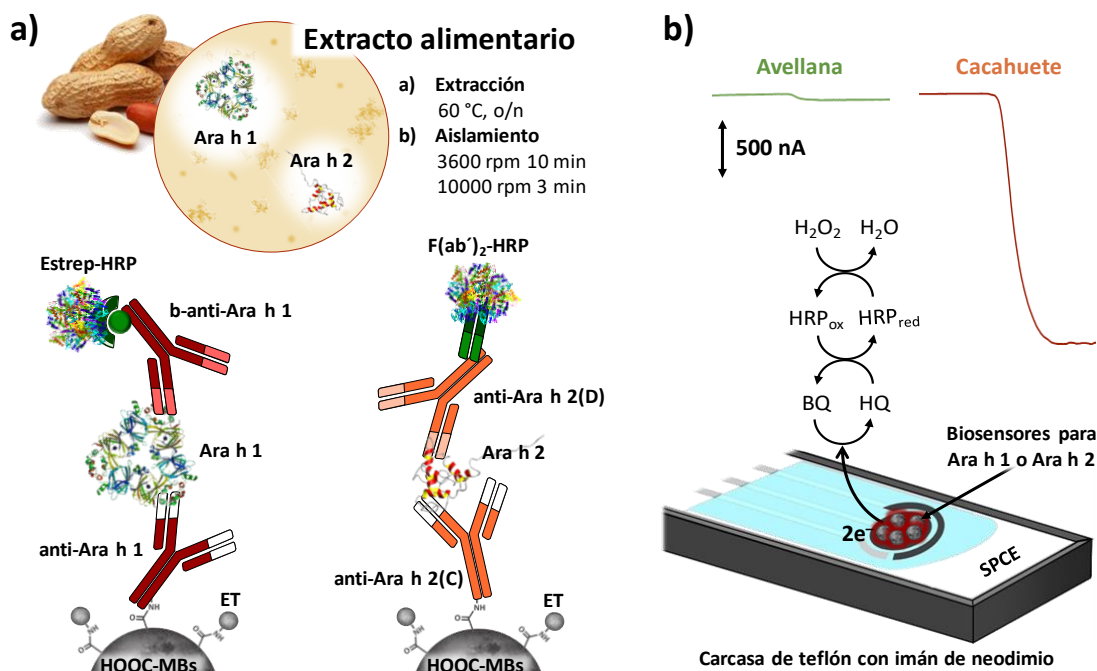


Fig. 4.10: a) Diagrama esquemático de las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación individual de Ara h 1 y Ara h 2 y protocolo empleado en la preparación de los extractos alimentarios analizados. b) MBs modificadas capturadas en la superficie del SPCE, reacciones enzimáticas implicadas en la detección amperométrica de la reducción del H_2O_2 mediada por HQ y amperogramas reales obtenidos en el análisis de extractos de frutos secos fritos diluidos 1000 veces con el inmunosensor amperométrico desarrollado para Ara h 1.

Los inmunosensores desarrollados, mostrados en la Fig. 4.10, están basados en el empleo de dos parejas de anticuerpos específicos, suministrados en kits ELISAs comerciales, para cada una de las proteínas diana. Las inmunoplateformas desarrolladas se basan en el empleo de los anticuerpos monoclonales suministrados (anti-Ara h 1 y anti-Ara h 2(C)) como anticuerpos de captura y los policlonales, modificados con biotina y sin modificar (b-anti-Ara h 1 y anti-Ara h 2(D), respectivamente) como anticuerpos de detección para la formación de los inmunocomplejos tipo sándwich y el marcaje de los mismos con conjugados enzimáticos de estreptavidina (Estrep-HRP) y fragmentos de anticuerpo secundario ($F(ab')_2$ -HRP) con peroxidasa de rábano para la determinación de Ara h 1 y Ara h 2, respectivamente.

4.1.2.1. Aseguramiento de la determinación a través de inmunoensayos tipo sándwich

Uno de los retos encontrados en esta Tesis consistió en asegurar la viabilidad del desarrollo de inmunosensores tipo sándwich sobre MBs para la determinación de los principales alérgenos proteicos del cacahuete, minimizando la adsorción de las proteínas diana sobre la superficie de las MBs sin modificar con los correspondientes anticuerpos de captura. Estas adsorciones inespecíficas pueden atribuirse a la interacción descrita de sus proteínas con algunos iones metálicos a niveles de traza, destacando la formación de complejos estables con Fe(III) [Ghatak, 2015]. La interacción de ambas proteínas diana, tanto con los iones férricos como con los compuestos fenólicos que conforman las MBs, más significativa en el caso de la proteína Ara h 1 [Zhou, 2013], se ha explotado por algunos autores para el desarrollo de métodos de extracción y eliminación de los alérgenos del cacahuete empleando MBs (sin modificar). Se ha descrito, además, que la incubación de extractos de cacahuete con MBs produce la reducción de su potencial alergénico, disminuyendo entre un 24–47 % su reconocimiento con IgEs.

Por ello, se evaluó en primer lugar, la posibilidad de reducir esta interacción no-específica (proteína alergénica-MBs) preparando los estándares de Ara h 1 en diferentes medios de trabajo: PBST sin suplementar o suplementado con 3 % (p/v) de BSA, 50 % (v/v) de leche entera UHT y una solución comercial de PBS suplementada con 1.0 % (p/v) de caseína. La comparación de las respuestas amperométricas obtenidas empleando MBs sin modificar y modificadas con el anticuerpo de captura (anti-Ara h 1-MBs), en ausencia y presencia de 250 ng mL⁻¹ de estándares de Ara h 1, se muestra en la Fig. 4.11.

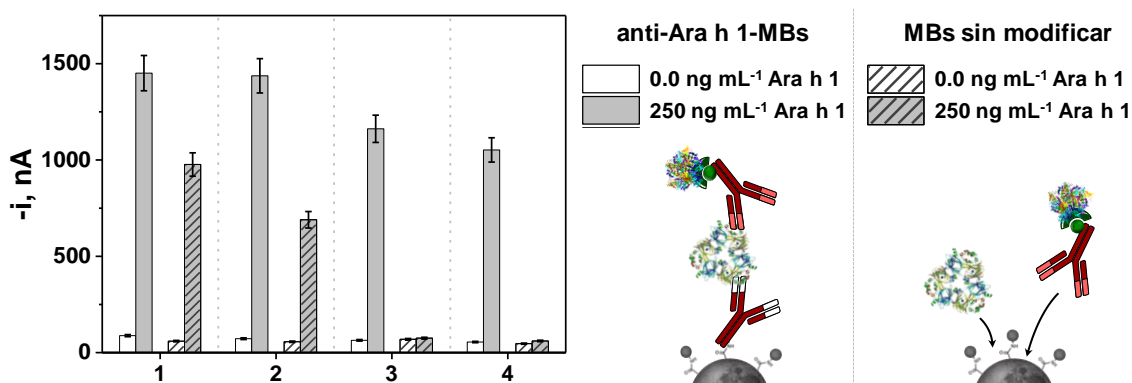


Fig. 4.11: Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (barras blancas) y presencia de 250 ng mL⁻¹ de estándares de Ara h 1 (barras grises) preparados en PBST (1), PBST suplementado con 3 % (p/v) de BSA (2), solución comercial bloqueante de caseína (3) y PBST:leche entera UHT (1:1) (4) empleando MBs sin modificar (barras rayadas) y modificadas con el anticuerpo de captura (anti-Ara h 1-MBs) (barras lisas) y dibujos esquemáticos de cada captor. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados mostrados en la Fig. 4.11 demuestran la captura específica de la proteína diana a través del anticuerpo de captura únicamente cuando las reacciones de bioreconocimiento se llevan a cabo en la solución comercial bloqueante de caseína (Fig. 4.11, barras 3) y en leche entera UHT diluida en PBST (1:1) (Fig. 4.11, barras 4). Las respuestas amperométricas significativas obtenidas en los otros medios de trabajo (Fig. 4.11, barras 1 y 2) confirman elevadas adsorciones inespecíficas de Ara h 1 sobre la superficie de las MBs sin modificar y no permiten asegurar la viabilidad del formato de inmunoensayo tipo sándwich. En vista de estos resultados, se seleccionó la solución comercial bloqueante de caseína tanto para la preparación de los analitos de interés como de los anticuerpos o reactivos conjugados con HRP requeridos para la formación de los inmunocomplejos tipo sándwich.

Una vez comprobada la viabilidad del desarrollo de plataformas basadas en formatos de inmunoensayo tipo sándwich para la determinación de las principales proteínas alergénicas del cacahuete, se optimizaron de forma sistemática las diferentes variables involucradas en su fabricación, tomándose como criterio para la selección de los valores óptimos la mejor relación resultante entre las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de concentraciones fijas de estándares de las proteínas diana (relación S/B). Todas las variables estudiadas para las plataformas amperométricas desarrolladas para la determinación individual de Ara h 1 y Ara h 2, así

como los valores seleccionados como óptimos para cada una de ellas, se resumen en la Tabla 4.5. Otras variables involucradas en el proceso de detección amperométrica, como las concentraciones de H₂O₂ e HQ y el potencial de detección a aplicar (-0.20 V vs. electrodo de referencia de Ag/AgCl), se optimizaron previamente en el Grupo de Investigación [Conzuelo, 2012-a], [Eguílaz, 2010], [Gamella, 2012].

A diferencia de las demás plataformas inmunosensoras implementadas en esta Tesis, la ausencia de anticuerpos de detección conjugados directamente con HRP para la detección de Ara h 1 y Ara h 2, hizo necesario el acoplamiento de los inmunocomplejos tipo sándwich empleados con reactivos conjugados con HRP para el marcaje enzimático de los anticuerpos de detección, empleando Estrep-HRP para el reconocimiento del anticuerpo de detección biotinilado para la determinación de Ara h 1 (b-anti-Ara h 1) y fragmentos Fab de anticuerpos conjugados con HRP para el reconocimiento específico de la región Fc del anticuerpo de detección empleado para la determinación de Ara h 2 (anti-Ara h 2(D), que en este caso es una inmunoglobulina de conejo). El empleo de reactivos secundarios conjugados con HRP para realizar el marcaje en inmunosensores, hace necesaria una evaluación más exhaustiva del número de etapas empleadas para la determinación del analito de interés. Estos estudios, realizados para ambas plataformas inmunosensoras, se describen y discuten brevemente a continuación.

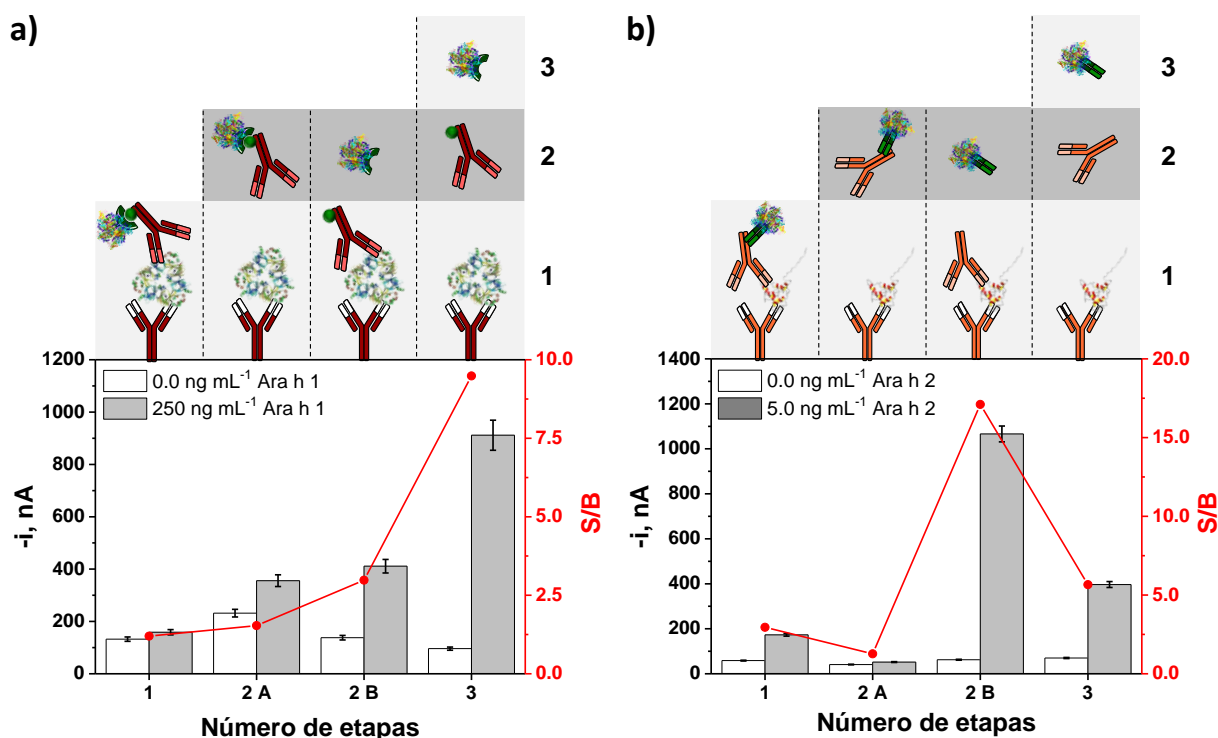


Fig. 4.12: Diagramas esquemáticos y dependencia de los valores de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y presencia (S, barras grises) de estándares de 250 o 5.0 ng mL⁻¹ de Ara h 1 o Ara h 2, respectivamente, y la relación de señales resultante (S/B, línea roja) en la evaluación del número de etapas de incubación empleadas para la preparación de los inmunosensores tipo sándwich basados en el empleo de Estrep-HRP o F(ab')₂-HRP para la determinación de Ara h 1 a) o Ara h 2 b). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar (n = 3).

La evaluación del número de etapas involucradas en la determinación de Ara h 1 y Ara h 2 se llevó a cabo empleando los siguientes procedimientos (realizándose, en todos los casos, etapas de incubación de 30 min):

- (1) Una etapa: que implica la incubación de los inmunocaptadores en una disolución mezcla que contiene el analito diana, el anticuerpo de detección y Estrep-HRP o F(ab')₂-HRP;
- (2A) Dos etapas: que involucran la captura de la proteína diana por los inmunocaptadores y su marcaje enzimático posterior con una disolución mezcla que contiene el anticuerpo de detección y Estrep-HRP o F(ab')₂-HRP;

- (2B) Dos etapas: que implican la formación del inmunocomplejo tipo sándwich en una primera etapa mediante la incubación de los inmunocaptadores con una disolución mezcla del analito diana y el anticuerpo de detección, y una segunda etapa para su marcaje enzimático mediante su incubación con Estrep-HRP o F(ab')₂-HRP; y
- (3) Tres etapas: que involucran la incubación secuencial de los inmunocaptadores con la proteína diana, el anticuerpo de detección y Estrep-HRP o F(ab')₂-HRP.

Los resultados obtenidos (Fig. 4.12 a)) muestran claramente la obtención de una mayor relación S/B en la detección de Ara h 1 empleando 3 etapas, que puede atribuirse a la minimización de las adsorciones inespecíficas en estas condiciones y a la dificultad de reconocimiento de la proteína diana por los inmunocaptadores magnéticos cuando se encuentra en disolución conjugada con el anticuerpo de detección y la Estrep-HRP. Este efecto puede resultar especialmente acusado para la determinación de la proteína Ara h 1 debido a que su estructura está compuesta por 3 monómeros idénticos, lo que puede causar su recubrimiento total con el anticuerpo de detección policlonal cuando se encuentran en disolución. Además, el empleo de Estrep-HRP para el marcaje enzimático puede suponer la unión de 4 anticuerpos de detección biotinilados por cada molécula de estreptavidina cuando se incuban de forma conjunta, aumentando el impedimento estérico y favoreciendo las adsorciones inespecíficas del complejo (b-anti-Ara h 1)₄-Estrep-HRP sobre la superficie de los inmunocaptadores (Fig 4.12, a) 2A).

Los resultados obtenidos en la evaluación del número de etapas involucradas para la detección de Ara h 2 (Fig. 4.12, b)) demuestran que la incubación de forma conjunta del anticuerpo de detección con el anticuerpo secundario empleado para su marcaje enzimático supone la obtención de las menores relaciones S/B (Fig 4.12 b) 1 y 2A), debido a la dificultad de reconocimiento de la proteína diana por el conjunto anti-Ara h 2(D)-F(ab')₂-HRP, por impedimento estérico. En este caso, la mejor relación S/B se obtiene cuando se lleva a cabo la formación del inmunocomplejo en disolución, mediante la incubación de los inmunocaptadores con Ara h 2 y anti-Ara h 2(D) (Fig. 4.12, b) 2B), debido, probablemente, al reconocimiento más eficiente del analito en disolución por el anticuerpo de detección y su marcaje enzimático posterior con F(ab')₂-HRP. Con el fin de obtener las mejores prestaciones analíticas en la

determinación de Ara h 1 y Ara h 2, se seleccionaron los protocolos que involucraban la preparación de los inmunosensores en 3 o 2 (2B) etapas, respectivamente.

Tabla 4.5. Variables experimentales optimizadas, intervalos evaluados y valores seleccionados como óptimos en el desarrollo de plataformas inmunosensoras amperométricas para la determinación individual de Ara h 1 y Ara h 2.

Variable experimental	Inmunosensor para Ara h 1		Inmunosensor para Ara h 2	
	Intervalo evaluado	Valor seleccionado	Intervalo evaluado	Valor seleccionado
$V_{\text{HOOC-MBs}}$, μL	2 – 6	3^a	2 – 6	3^a
[anti-(Ara h 1 o 2(C))], $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.0 – 100.0	25.0	2.5 – 100.0	50.0
Tiempo de incubación del anti-(Ara h 1 o 2(C)), min	15 – 60	30	15 – 90	15
Factor de dilución del b-anti-Ara h 1 o anti-Ara h 2(D)	1/25000 – 1/1000	1/10000	1/5000 – 1/250	1/1000
Dilución Estrep-HRP	1/5000 – 1/500 ^a	1/1000^a	–	–
Dilución F(ab') ₂ -HRP	–	–	1/50000 – 1/250	1/10000
Número de etapas	1 – 3	3	1 – 3	2
Tiempo de incubación de la proteína diana, min	15 – 60	45	15 – 90	45
Tiempo de incubación del b-anti-Ara h 1 o anti-Ara h 2(D), min	15 – 60	45		
Tiempo de incubación del marcaje enzimático	15 – 60 ^a	30^a	15 – 90	30

^aVariables optimizadas en trabajos previos del Grupo de Investigación [Esteban-Fernández de Ávila, 2013].

Trabajando en las condiciones experimentales optimizadas (resumidas en la Tabla 4.5), se caracterizó el comportamiento analítico y operacional de las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación amperométrica individual de estándares de diferente concentración de Ara h 1 y Ara h 2, obteniéndose las rectas de calibrado que se muestran en la Fig. 4.13 y los parámetros que se resumen en la Tabla

4.6. Los valores de LD y LC se estimaron de acuerdo con los criterios descritos en el apartado 4.1.1.1 a partir de la desviación estándar calculada para 10 valores de intensidad de corriente obtenidos en ausencia de estándar de proteína diana y los valores de las pendientes de calibrado recogidas en la Tabla 4.6.

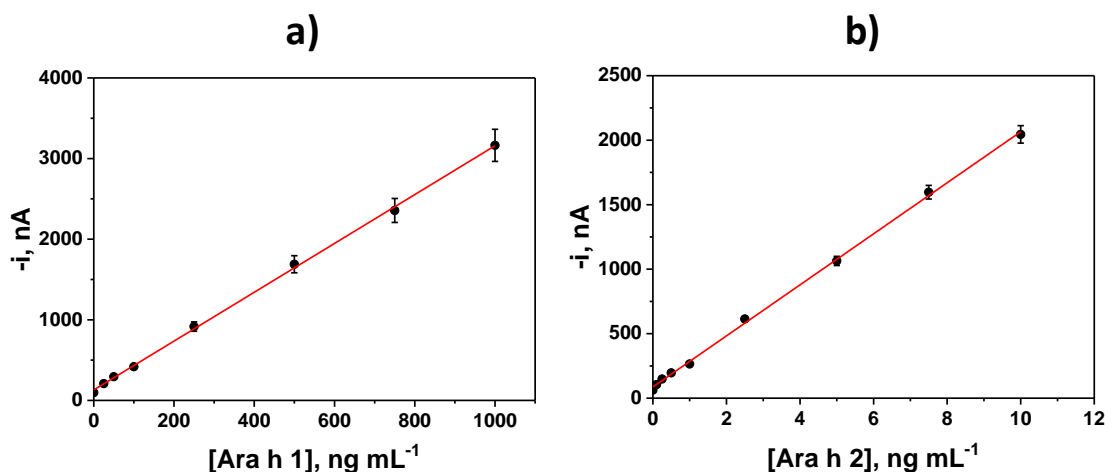


Fig. 4.13: Rectas de calibrado obtenidas en la determinación amperométrica de estándares de Ara h 1 a) y Ara h 2 b) con las plataformas inmunosensoras desarrolladas. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Tabla 4.6. Características analíticas y operacionales obtenidas con las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación amperométrica de estándares de Ara h 1 y Ara h 2.

	Inmunosensor para Ara h 1	Inmunosensor para Ara h 2
r	0.999	0.999
Pendiente, nA mL ng⁻¹	(3.03 ± 0.03)	(198 ± 2)
Ordenada en el origen, nA	(130 ± 13)	(87 ± 8)
Intervalo lineal, ng mL⁻¹	20.8 – 1000.0	0.087 – 10.0
LD, ng mL⁻¹	6.3 (158 pg)	0.026 (0.65 pg)
LC, ng mL⁻¹	20.8 (520 pg)	0.087 (2.18 pg)
RSD, %	6.3 (500.0 ng mL ⁻¹ , n = 6)	3.3 (2.5 ng mL ⁻¹ , n = 10)
Estabilidad, días	25	50

Las características analíticas y operacionales obtenidas (calculadas de forma análoga a lo comentado en el apartado 4.1.1.1) demuestran que el empleo de la solución

bloqueante de caseína permite un mayor control y la reducción de las adsorciones inespecíficas de los bioreactivos empleados en la implementación de las plataformas inmunosensoras desarrolladas para Ara h 1 y Ara h 2, permitiendo disminuir los valores de las ordenadas en el origen y mejorar, en gran medida, los valores de RSD obtenidos en comparación con los calculados en la determinación de β -LG o α -LA. Cabe destacar, además, la posibilidad de emplear los inmunocaptadores preparados durante 25 o 50 días posteriores a su fabricación, para la determinación de Ara h 1 y Ara h 2, respectivamente, sin pérdida significativa de sensibilidad.

La comparación de los valores de LD obtenidos para ambas plataformas permite concluir que la mayor sensibilidad encontrada en la determinación de Ara h 2, en comparación con Ara h 1, puede deberse tanto a la mayor afinidad de la pareja de anticuerpos seleccionados para Ara h 2, como al empleo de un fragmento de anticuerpo conjugado con HRP para realizar el marcaje enzimático. Estos resultados están de acuerdo con observaciones descritas por otros autores y casas comerciales, que justifican la mejor sensibilidad en este tipo de ensayo por el hecho de que múltiples anticuerpos secundarios ($F(ab')_2$ -HRP) pueden reconocer cada molécula de anticuerpo de detección (anti-Ara h 2(D)), incrementando así el número de moléculas de HRP y amplificando la respuesta [MacPhee, 2010], [P. Web, Jackson ImmunoResearch]. Además, esta amplificación estaría favorecida gracias al empleo de un fragmento de anticuerpo conjugado con HRP como anticuerpo secundario, reduciendo en gran medida el impedimento estérico en el reconocimiento del analito por parte del anti-Ara h 2(D)/ $F(ab')_2$ -HRP.

Es importante destacar en este punto que, tal y como se ha descrito con oligonucleótidos [Miranda-Castro, 2018], [González-Álvarez, 2013] o anticuerpos biotinilados [Delaive, 2008], la multivalencia de la estreptavidina puede causar reactividad cruzada entre varios anticuerpos biotinilados, lo que conllevaría a la unión de un menor número de moléculas de HRP por anticuerpo biotinilado, y por tanto, una menor sensibilidad en el ensayo. Este fenómeno podría justificar también la mayor sensibilidad en el reconocimiento anti-Ara h 2(D)/ $F(ab')_2$ -HRP en comparación con la interacción biotina/estreptavidina empleada en el inmunosensor desarrollado para Ara h 1. Se incluye una comparación más exhaustiva de las características analíticas y aplicación real de las plataformas individuales desarrolladas en los apartados 4.1.2.3 y 4.1.2.4.

4.1.2.2. Evaluación de la selectividad

Con el fin de caracterizar la selectividad de las inmunoplateformas desarrolladas se evaluó la reactividad cruzada entre las proteínas diana (Ara h 1 y Ara h 2) y su determinación en presencia de otras como BSA y ovoalbúmina (OVA) con las que pueden coexistir en extractos alimentarios. Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 y 250 ng mL⁻¹ de Ara h 1 o 0.0 y 2.5 ng mL⁻¹ de Ara h 2, preparados en ausencia y presencia de cada interferente en la concentración en la que se encuentran habitualmente en matrices alimentarias.

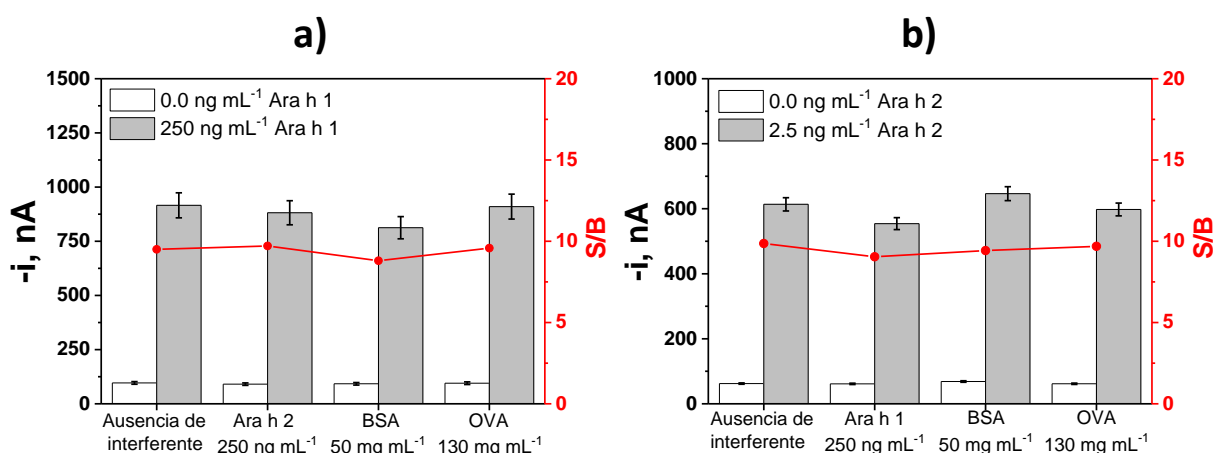


Fig. 4.14: Respuestas amperométricas obtenidas con las plataformas inmunosensoras desarrolladas para Ara h 1 a) y Ara h 2 b) para estándares de 0.0 y 250 ng mL⁻¹ Ara h 1 a) o 2.5 ng mL⁻¹ Ara h 2 b) preparados en ausencia y presencia de 250 ng mL⁻¹ de Ara h 2 o Ara h 1, respectivamente, 50 mg mL⁻¹ de BSA o 130 mg mL⁻¹ de OVA. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados mostrados en la Fig. 4.14 demostraron la ausencia de interferencias significativas para todas las proteínas ensayadas, incluso en presencia de elevadas concentraciones ensayadas de BSA y OVA. Cabe destacar también que, a pesar de presentar dominios estructurales similares [Bublin, 2014], no se observó reactividad cruzada entre Ara h 1 y Ara h 2 cuando se evalúan a la misma concentración (plataforma inmunosensora para Ara h 1, Fig. 4.14, a) o a concentración 100 veces superior (plataforma inmunosensora para Ara h 2, Fig. 4.14, b).

4.1.2.3. Determinación de Ara h 1 en matrices alimentarias y saliva

La plataforma inmunosensora desarrollada para la determinación individual de Ara h 1 se aplicó al análisis de diversos extractos alimentarios: cacahuete frito y crudo, cacahuete recubierto de chocolate, barritas de chocolate y cacahuete tostado, cremas de cacahuete, aceite de cacahuete y avellana cruda, empleando los protocolos descritos en los apartados 3.3.1 y 3.3.7.2 para la extracción y análisis de la proteína diana, respectivamente.

Tras asegurar la ausencia de efecto matriz en cada una de las muestras analizadas, mediante la comparación estadística de las pendientes de las curvas de calibrado construidas en solución bloqueante de caseína (Fig. 4.13) y en cada extracto alimentario, adecuadamente diluidos (dil. 1/100 – 1/1000 en solución bloqueante de caseína) y suplementados con cantidades crecientes de Ara h 1 hasta 750 ng mL⁻¹ la determinación del contenido de Ara h 1 se realizó por interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para cada uno de los extractos preparados, convenientemente diluidos, en el calibrado externo construido con disoluciones estándares. Para evaluar la exactitud de la metodología desarrollada, se compararon los resultados obtenidos con los proporcionados por un kit ELISA comercial (recogidos en la Tabla 4.7), basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos.

Tabla 4.7. Contenidos de Ara h 1 (en mg g⁻¹) proporcionados por la plataforma inmunosensora amperométrica desarrollada y por un kit ELISA espectrofotométrico comercial basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos, en extractos obtenidos a partir de cacahuete frito y crudo, cacahuete recubierto de chocolate, barras de chocolate y cacahuete tostado, cremas de cacahuete, aceite de cacahuete y avellana cruda.

Extractos analizados	Factor de dilución	Plataforma inmunosensora	ELISA
Cacahuete frito	1/1000	(7.4 ± 1.0) RSD _(n=3) = 5.4 %	(7.5 ± 1.3) RSD _(n=3) = 6.9 %
Cacahuete crudo	1/1000	(2.9 ± 0.2) RSD _(n=3) = 3.3 %	(3.0 ± 0.6) RSD _(n=3) = 7.8 %
Cacahuete recubierto de chocolate	1/250	(0.026 ± 0.003) RSD _(n=3) = 5.1 %	(0.028 ± 0.004) RSD _(n=3) = 6.1 %
Barritas de chocolate y cacahuete tostado	1/250	(0.155 ± 0.001) RSD _(n=3) = 0.3 %	(0.16 ± 0.03) RSD _(n=3) = 7.9 %
Crema de cacahuete 1	1/500	(1.8 ± 0.3) RSD _(n=3) = 6.7 %	(1.8 ± 0.4) RSD _(n=3) = 9.0 %
Crema de cacahuete 2	1/1000	(4.3 ± 0.6) RSD _(n=3) = 5.7 %	(4.7 ± 0.5) RSD _(n=3) = 3.9 %
Aceite de cacahuete	1/100	< LD	< LD
Avellana cruda	1/100	< LD	< LD

La comparación de los valores obtenidos por ambas metodologías (Tabla 4.7) se realizó empleando un ensayo de hipótesis utilizando el método de la t de Student, demostrando la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios encontrados para todas las muestras analizadas al nivel de significación del 95 % ($p = 0.05$). Estos resultados demuestran la viabilidad de la plataforma desarrollada para la determinación del contenido de Ara h 1 en extractos alimentarios complejos y la elevada selectividad de la metodología en el análisis de otros frutos secos, como la avellana, o el aceite de cacahuete, cuyo procesamiento implica la eliminación del contenido proteico total. Además, los valores obtenidos están de acuerdo con los descritos en la literatura, de (0.5–15) mg g⁻¹, para extractos de cacahuete [Pomés, 2003]. Cabe destacar la obtención de concentraciones de Ara h 1 2.5 veces superiores en cacahuete frito que en el crudo, lo que se atribuye a la extracción más eficiente de la proteína diana en alimentos procesados, y que está de acuerdo con el mayor potencial alergénico descrito para cacahuete frito o tostado [Pomés, 2006].

Teniendo en cuenta el elevado potencial alergénico del cacahuete, incluso a niveles de traza, se evaluó la sensibilidad de la plataforma desarrollada para la detección de cacahuete a estos niveles, mediante la determinación de Ara h 1. Dada la ausencia de materiales de referencia con contenidos certificados de Ara h 1, estos estudios se llevaron a cabo analizando matrices alimentarias contaminadas con la proteína diana o cacahuete a los niveles deseados.

En primer lugar, se evaluó la determinación de Ara h 1 directamente en extractos de galleta sin diluir (libres de Ara h 1) contaminados con estándares de 50, 100 y 250 ng mL⁻¹ de la proteína diana. Los valores medios encontrados junto con los porcentajes de recuperación obtenidos resultaron de (50 ± 4) ng mL⁻¹ y (100 ± 8) %, (99 ± 8) ng mL⁻¹ y (99 ± 8) % y (257 ± 18) ng mL⁻¹ y (103 ± 8) %, respectivamente.

También se emplearon muestras de galleta libres de cacahuete o suplementadas con cantidades de cacahuete frito comprendidas entre (500–25000) mg Kg⁻¹, realizándose posteriormente la extracción de sus proteínas hidrosolubles y el análisis de los extractos resultantes diluidos 10 veces en solución bloqueante de caseína. Los resultados obtenidos demostraron la posibilidad de detectar, con la plataforma inmunosensora desarrollada, la presencia de cacahuete en todo el intervalo de concentraciones evaluado. A modo de ejemplo se muestran los amperogramas reales y los resultados obtenidos en la detección de 0.0, 500 y 1000 mg Kg⁻¹ de cacahuete frito en muestras de galleta.

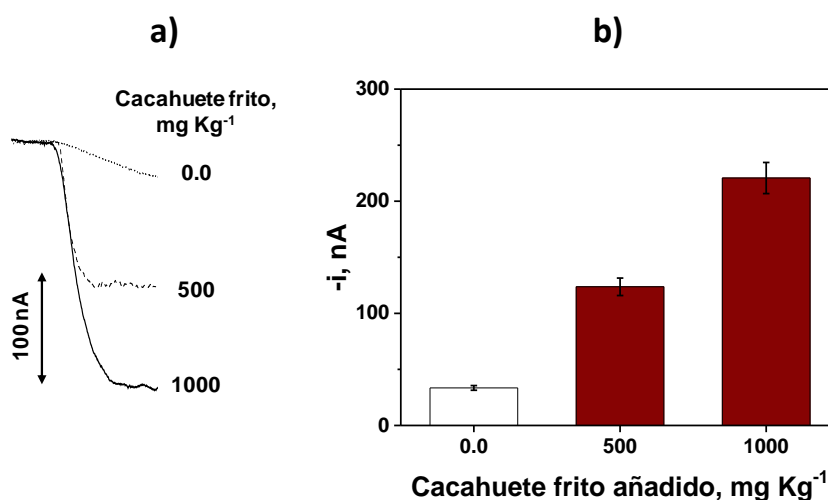


Fig. 4.15: Amperogramas reales a) y respuestas amperométricas b) obtenidas con la plataforma inmunosensora desarrollada para la determinación de Ara h 1 en el análisis de extractos de muestras de galletas sin suplementar o suplementadas con 500 y 1000 mg Kg⁻¹ de cacahuete frito. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos demostraron la posibilidad de determinar Ara h 1 directamente en extractos alimentarios complejos en el mismo intervalo de concentraciones empleado en la evaluación de sus características analíticas con disoluciones estándar. Cabe destacar, además, la posibilidad de detectar fácilmente la presencia de 500 mg Kg⁻¹ de cacahuete frito en otras matrices alimentarias, lo que confirma la determinación de Ara h 1 a niveles de traza (3.7 mg Kg⁻¹, teniendo en cuenta el contenido de Ara h 1 en cacahuete frito, Tabla 4.7).

Otra fuente significativa de exposición al cacahuete se puede producir a través de la saliva, en acciones tan cotidianas como compartir utensilios de cocina o un simple beso. Esto es debido, principalmente, a la estructura en forma de trímero de la proteína Ara h 1, que previene y reduce en gran medida la desnaturalización de los epítomos que la conforman, siendo uno de los alérgenos del cacahuete con mayor resistencia a la descomposición en el tracto digestivo [Maleki, 2000], [Zhou, 2013]. Por ello, existe la necesidad urgente del desarrollo de metodologías que permitan la evaluación del potencial alergénico del cacahuete en este fluido biológico y el establecimiento de tiempos de precaución tras su ingesta, que aseguren la máxima protección de la población sensibilizada. Por ello se aplicó la plataforma desarrollada a la determinación de Ara h 1 directamente en muestras de saliva humana.

En primer lugar, se evaluó la posibilidad de cuantificar la proteína diana en saliva, mediante la construcción de un calibrado con estándares de Ara h 1 directamente en muestra de saliva humana cruda sin diluir, obteniendo una pendiente de (1.9 ± 0.6) ng mL⁻¹. Estos resultados, que confirman una pérdida de sensibilidad del 36 %, en comparación con la obtenida para los estándares preparados en solución bloqueante de caseína $((3.03 \pm 0.03)$ ng mL⁻¹, Tabla 4.6), no supusieron ninguna limitación en la aplicación de la plataforma desarrollada. Es importante destacar en este punto la ausencia de diferencias significativas entre los calibrados obtenidos para muestras de saliva de diferentes individuos, lo que permite el empleo de un calibrado representativo en este fluido para realizar la determinación de Ara h 1 en muestras de saliva de cualquier individuo.

La metodología desarrollada se aplicó a la determinación de Ara h 1 en la saliva de distintos individuos, recogida antes y a distintos tiempos después de la ingesta de un sándwich preparado con dos cucharadas de crema de cacahuete. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.16.

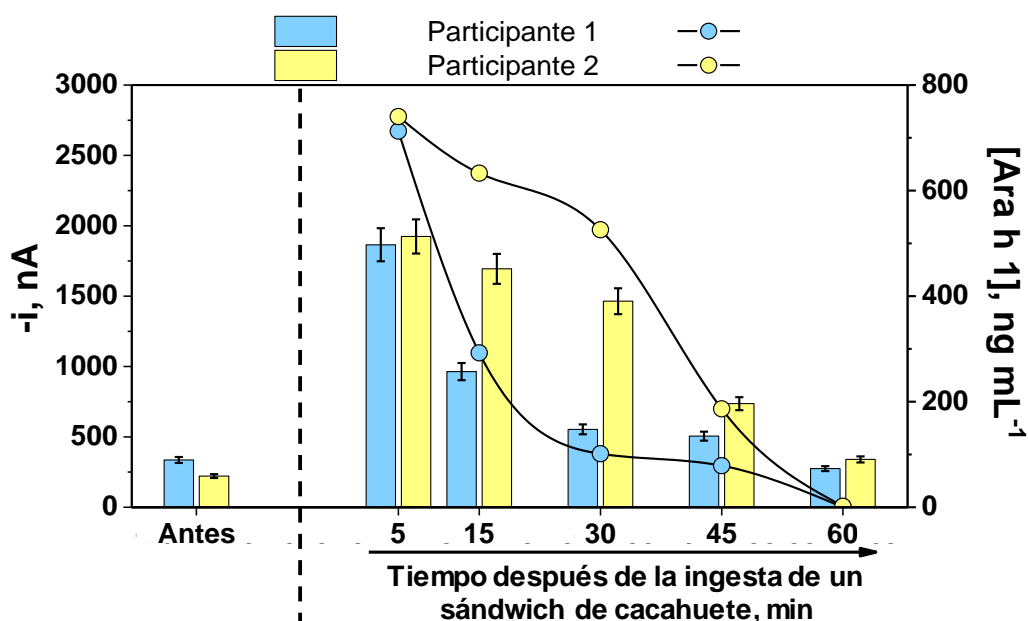


Fig. 4.16: Respuestas amperométricas obtenidas (barras, eje “y” izquierdo) y concentraciones resultantes de la proteína diana (líneas y puntos, eje “y” derecho) con la plataforma desarrollada para la determinación de Ara h 1 en el análisis de muestras de saliva cruda sin diluir de dos participantes, obtenidas antes y a distintos tiempos (5, 15, 30, 45 y 60 min) tras la ingesta de un sándwich preparado con dos cucharadas de crema de cacahuete. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos para ambos voluntarios demostraron valores similares y máximos de Ara h 1 a los 5 min posteriores a la ingesta (valores de 713 y 740 ng mL^{-1}), y la disminución acusada de la presencia de Ara h 1 con el tiempo, en función de la deglución de cada participante hasta 60 min, donde los valores de Ara h 1 no fueron detectables. Estos resultados concuerdan con los descritos empleando un método ELISA [Maloney, 2006].

Todos estos estudios demuestran la elevada selectividad, fiabilidad y reproducibilidad de la plataforma inmunosensora desarrollada para la determinación amperométrica de Ara h 1 en matrices alimentarias, incluso a niveles de traza y en fluidos biológicos complejos como la saliva. Es importante mencionar que este ha sido el primer inmunosensor electroquímico aplicado a la determinación de Ara h 1 directamente en saliva humana cruda sin diluir.

Una comparación más exhaustiva de la sensibilidad obtenida ($\text{LD} = 6.3 \text{ ng mL}^{-1}$) para la determinación de Ara h 1 en comparación con los demostrados por otros inmunosensores electroquímicos demuestra mejores LDs que los reportados por Huang

y col. (20 ng mL⁻¹, [Huang, 2008]), y ligeramente superiores a los reportados por Alves y col. (3.8 ng mL⁻¹, [Alves, 2015-a]). Sin embargo, estos inmunosensores están basados en el empleo de nanomateriales que requieren protocolos laboriosos de preparación y tiempos de ensayo comprendidos entre 16 y 19 h, frente a las 2 h que requiere la inmunoplateforma desarrollada. Además, es interesante destacar que, aunque el inmunosensor desarrollado proporciona sensibilidades similares a los kits ELISA espectrofotométricos comerciales disponibles para la determinación de Ara h 1, la estrategia desarrollada simplifica en gran medida los procedimientos analíticos, reduciendo a la mitad el tiempo de análisis (2 vs. 4 h). Todo ello, junto con el empleo de instrumentación de bajo coste, fácilmente miniaturizable y portátil, lo convierten en una herramienta atractiva para el desarrollo de dispositivos de cribado fáciles de usar para determinaciones rutinarias en el punto de atención.

Además, el desarrollo de plataformas desechables resulta especialmente interesante para el análisis de fluidos biológicos, disminuyendo así los riesgos de contaminación y para el analista.

4.1.2.4. Determinación de Ara h 2 en matrices alimentarias

La plataforma desarrollada para la determinación individual de Ara h 2 también se aplicó al análisis de muestras comerciales libres de cacahuete como la harina de trigo y avellana, o con contenidos endógenos variables de este fruto seco: cacahuete frito y crudo, cacahuets recubiertos con chocolate, barritas de chocolate o multicereales con cacahuete tostado y cremas, aceite y harina de cacahuete. Los resultados obtenidos en el análisis de los extractos resultantes con la plataforma inmunosensora desarrollada y con un kit espectrofotométrico ELISA comercial, que emplea los mismos inmunoreactivos, se comparan en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Contenido de Ara h 2 (en mg g⁻¹) encontrado en extractos alimentarios obtenidos a partir de cacahuete frito y crudo, cacahuete recubierto de chocolate, barritas de chocolate y multicereales con cacahuete tostado, cremas de cacahuete, aceite de cacahuete, avellana cruda y harinas de cacahuete y trigo analizados con la plataforma inmunosensora amperométrica desarrollada y con un kit ELISA espectrofotométrico comercial basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos.

Extractos analizados	Factor de dilución	Plataforma inmunosensora	ELISA
Cacahuete frito	1/100000	(4.3 ± 0.3) RSD _(n=3) = 2.7 %	(4.4 ± 0.3) RSD _(n=3) = 6.4 %
Cacahuete crudo	1/100000	(4.3 ± 0.4) RSD _(n=3) = 3.6 %	(4.1 ± 0.4) RSD _(n=3) = 4.3 %
Cacahuete recubierto de chocolate	1/1000	(0.033 ± 0.005) RSD _(n=3) = 6.5 %	(0.034 ± 0.006) RSD _(n=3) = 6.5 %
Barritas de chocolate y cacahuete tostado	1/10000	(0.31 ± 0.04) RSD _(n=3) = 5.5 %	(0.38 ± 0.02) RSD _(n=3) = 2.4 %
Barritas multicereales y cacahuete tostado	1/100000	(3.5 ± 0.6) RSD _(n=3) = 6.5 %	(3.4 ± 0.5) RSD _(n=3) = 6.1 %
Crema de cacahuete 1	1/100000	(3.6 ± 0.3) RSD _(n=3) = 3.4 %	(3.6 ± 0.8) RSD _(n=3) = 8.8 %
Crema de cacahuete 2	1/100000	(1.3 ± 0.3) RSD _(n=3) = 8.6 %	(1.4 ± 0.2) RSD _(n=3) = 6.3 %
Aceite de cacahuete	1/1000	(0.0022 ± 0.0004) RSD _(n=3) = 6.5 %	(0.0023 ± 0.0004) RSD _(n=3) = 7.0 %
Harina de cacahuete	1/500000	(10.9 ± 0.7) RSD _(n=3) = 2.5 %	(11 ± 1) RSD _(n=3) = 4.0 %
Harina de trigo	--	< LD	< LD
Avellana cruda	--	< LD	< LD

En primer lugar, se aseguró la ausencia de efecto matriz en todas las muestras analizadas por comparación de las pendientes obtenidas para los calibrados construidos en los extractos de cada muestra, adecuadamente diluidos, suplementados con concentraciones crecientes de Ara h 2 hasta 2.5 ng mL⁻¹, con la pendiente del calibrado obtenido para estándares (Fig. 4.13).

Los resultados obtenidos se correlacionaban satisfactoriamente con los proporcionados por la metodología ELISA convencional, basada en el empleo de los mismos inmunoreactivos, obteniéndose una regresión lineal ($r = 0.999$) de pendiente (0.997 ± 0.009) y ordenada en el origen (0.003 ± 0.039), que incluyen el 1 y el 0, respectivamente. Los resultados encontrados demuestran que, al igual que sucede con la

proteína Ara h 1, los contenidos de Ara h 2 dependen del tipo de procesado que ha sufrido el alimento, y que el empleo de la proteína Ara h 2 como diana para la detección de cacahuete permitió la detección de esta proteína a niveles de traza incluso en aceite de cacahuete ($2.2 \mu\text{g g}^{-1}$ de Ara h 2).

Resulta destacable que, además de ser la primera y única plataforma inmunosensora descrita hasta la fecha para la determinación electroquímica de Ara h 2, permite llevar a cabo el análisis de muestras alimentarias complejas, empleando tiempos de análisis y volúmenes de inmunoreactivos reducidos, comparados con la metodología ELISA convencional: (2 vs. 4 h) y (25 vs. 100 μL), respectivamente. Estos atributos, además de simplificar en gran medida el procedimiento analítico, suponen un ahorro importante de los costes por análisis, factores de gran importancia en el desarrollo de dispositivos para determinaciones rutinarias en entornos descentralizados.

Teniendo en cuenta la mayor sensibilidad del inmunosensor desarrollado para la determinación de Ara h 2, se evaluó su aplicabilidad para la detección de cacahuete a niveles de traza. La comparación de los resultados obtenidos con las plataformas inmunosensoras desarrolladas para Ara h 1 y Ara h 2 en el análisis de muestras de harina de trigo (libre de cacahuets) suplementadas con diferentes concentraciones de harina de cacahuete, se muestran en la Fig. 4.17.

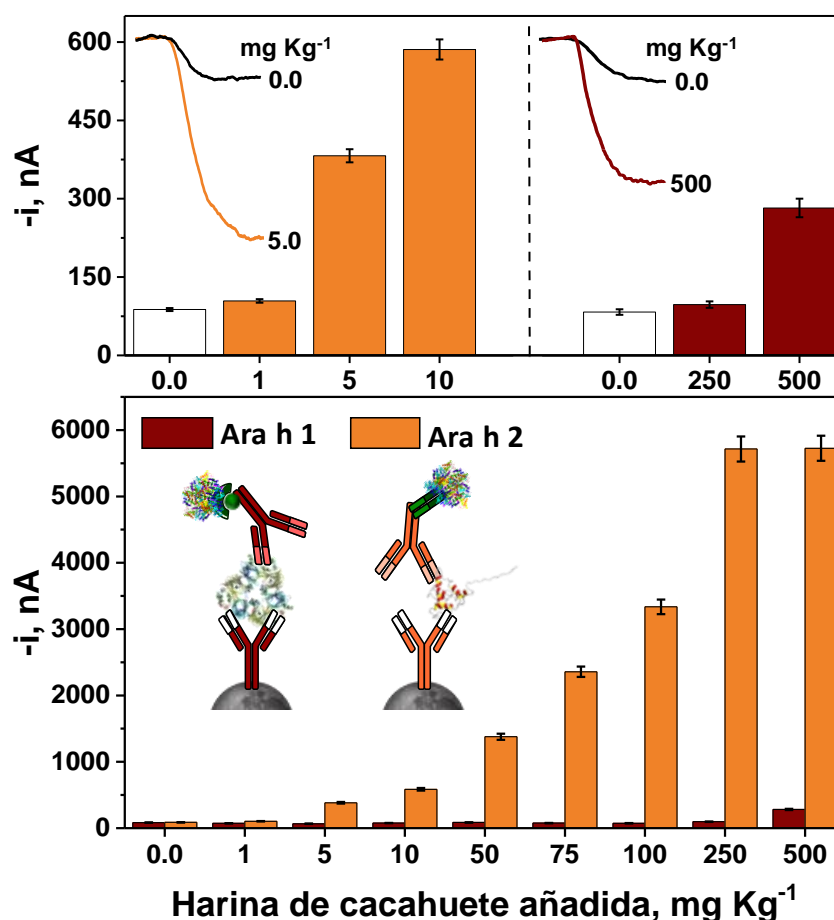


Fig. 4.17: Respuestas amperométricas obtenidas con las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación amperométrica individual de Ara h 1 (barras granates) y Ara h 2 (barras naranjas) en el análisis de extractos de harina de trigo (libres de cacahuete) sin suplementar y suplementadas con concentraciones de harina de cacahuete, comprendidas entre 1 y 500 mg Kg⁻¹. Amperogramas reales de las respuestas amperométricas obtenidas para las muestras sin suplementar (líneas negras) y suplementadas con 500 mg Kg⁻¹ (línea granate, para Ara h 1) y 5.0 mg Kg⁻¹ (línea naranja, para Ara h 2) de harina de cacahuete. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos con la plataforma inmunosensora desarrollada para Ara h 2 (Fig. 4.17, barras naranjas) demostraron la posibilidad de detectar claramente la presencia de 5.0 mg Kg⁻¹ de cacahuete (< 0.055 mg Kg⁻¹ de la proteína Ara h 2) en esta matriz alimentaria. Estos resultados mejoran entre 100–200 veces los valores descritos con otras inmunoplateformas electroquímicas para la detección de 500 (3.7 mg Kg⁻¹ de Ara h 1, plataforma desarrollada para Ara h 1 en esta Tesis Doctoral) y 1000 mg Kg⁻¹ (8.7 mg Kg⁻¹ de Ara h 1 [Alves, 2015-a] o 3.7 mg Kg⁻¹ de Ara h 6 [Alves, 2015-b]) de cacahuete.

Esta sensibilidad significativamente superior para la detección de cacahuete puede atribuirse tanto a la mayor eficiencia de extracción de la proteína Ara h 2, en comparación con otras proteínas alergénicas de mayor tamaño como Ara h 1 (17.5 vs. 65 kDa, respectivamente), como a la mayor sensibilidad demostrada en el análisis de la proteína diana, alcanzando un LD de 26 pg mL⁻¹ en la detección de Ara h 2, entre 10–242 veces inferior a los descritos para la detección de otras proteínas alergénicas del cacahuete: 3.8 (esta Tesis Doctoral) o 6.3 [Alves, 2015-a] ng mL⁻¹ para Ara h 1 y 0.27 ng mL⁻¹ para Ara h 6 [Alves, 2015-b].

Además, los niveles de cacahuete detectados se encuentran en los mismos intervalos descritos (2–10 mg Kg⁻¹) empleando estrategias de amplificación del material genético por PCR [Lopez-Calleja, 2013], [Watanabe, 2006], [Scaravelli, 2008], [Köppel, 2010]. En este punto cabe destacar la dificultad de amplificación por PCR de extractos de ADN de origen vegetal, debido a que los aceites y grasas vegetales complican la eliminación de inhibidores de la amplificación. Todo ello implica la necesidad de acoplamiento de distintas estrategias de extracción y aislamiento para la obtención de extractos vegetales de calidad para su amplificación eficiente por PCR cuantitativa (qPCR) [Ramos-Gómez, 2014]. Los resultados presentados y discutidos demuestran que la plataforma desarrollada permite la detección de niveles de 10 mg Kg⁻¹, considerados de relevancia en la detección de residuos potencialmente peligrosos, de alérgenos no declarados en alimentos, empleando sencillos protocolos de extracción del contenido proteico de matrices alimentarias de distinta naturaleza.

En este punto se puede concluir que la selección de Ara h 2 como biomarcador de sensibilización, junto con las prestaciones analíticas mejoradas obtenidas para su determinación con la plataforma inmunosensora puesta a punto, han permitido desarrollar una herramienta potencialmente atractiva en términos de sencillez y tiempo de ensayo, frente a las empleadas convencionalmente, para el desarrollo de dispositivos que aseguren la ausencia de este fruto seco a niveles de traza en alimentos complejos y procesados, y por tanto, la máxima protección de la población sensibilizada.

4.1.3. Inmunosensor para la determinación de ovomucoide

En este apartado se discuten los resultados más relevantes de los artículos: *Benedé et al. Fast amperometric immunoplatfrom for ovomucoid traces determination in fresh and baked foods. Sens. Actuators B-Chem. 265 (2018) 421–428* y *Benedé y col. Biosensor para detectar huevo. Revista alimentaria 500 (2019) 18–21*, aportados como anexos al final de esta Tesis Doctoral.

Para el desarrollo de la última plataforma inmunosensora individual para seguridad alimentaria se puso el foco de atención en la alergia al huevo, que es, junto con la leche, uno de los alimentos con mayor impacto en la población infantil europea por sensibilización alimentaria [Benedé, 2015]. El ovomucoide (OM) es una de las principales proteínas alergénicas encontradas en la clara del huevo, debido a su elevado contenido endógeno, estabilidad térmica y resistencia a la digestión [Leduc, 1999], [Matsuda, 1982], por lo que se seleccionó como proteína diana para el desarrollo de una plataforma inmunosensora electroquímica para detectar la presencia de huevo.

La metodología desarrollada está basada en el empleo de SPCEs y MBs como μ -soportes sólidos para la construcción del inmunosensor, empleando el mismo anticuerpo policlonal específico para OM, sin modificar (anti-OM) y conjugado con HRP (anti-OM-HRP), como anticuerpo de captura y detección, respectivamente. El proceso de fabricación de los inmunocaptadores se realizó mediante la inmovilización covalente del anti-OM sobre la superficie de las MBs funcionalizadas con grupos carboxílicos. Realizando posteriormente la formación del inmunocomplejo tipo sándwich en una única etapa de incubación de las anti-OM-MBs con la proteína diana y el anti-OM-HRP, durante 30 min.

Todas las reacciones de inmunoreconocimiento se llevaron a cabo sobre la superficie de los inmunocaptadores magnéticos, empleándose SPCEs para la transducción amperométrica a -0.20 V (vs. pseudoreferencia de Ag/AgCl) monitorizándose la variación de corriente catódica correspondiente a la reducción enzimática de H_2O_2 mediada por la HQ. Los fundamentos de la plataforma inmunosensora tipo sándwich implementada sobre MBs, así como su captura magnética sobre la superficie de los

SPCEs y la transducción amperométrica en presencia del sistema H_2O_2/HQ , se muestran de forma esquemática en la Fig. 4.18.

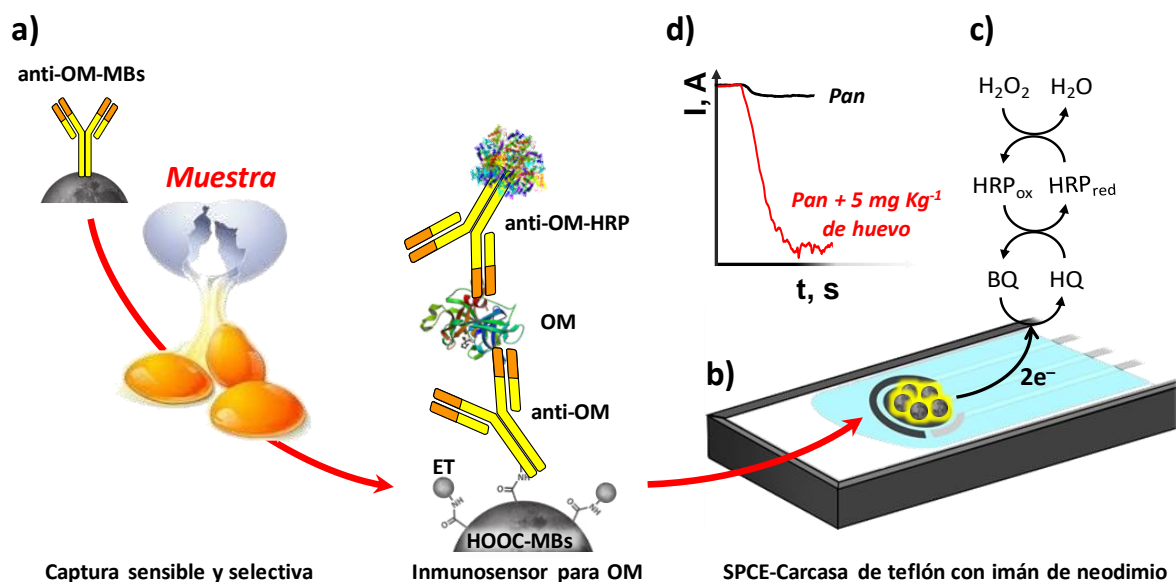


Fig. 4.18: Diagrama esquemático de la plataforma inmunosensora desarrollada para la determinación individual de OM a). Conjunto inmunosensor-SPCE-carcasa con imán de neodimio b), reacciones enzimáticas implicadas en la detección amperométrica de la reducción enzimática del H_2O_2 mediada por HQ c) y amperogramas reales obtenidos en el análisis de muestras de pan suplementado con 5 mg Kg⁻¹ de huevo d).

4.1.3.1. Implementación del inmunosensor para la determinación de ovomucoide

En primer lugar, se procedió a asegurar la viabilidad del inmunoensayo tipo sándwich sobre MBs para la determinación de OM. Para ello, se evaluaron las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B) y presencia de 5.0 ng mL⁻¹ de la proteína diana (S) empleando MBs sin modificar y modificadas con el anticuerpo de captura (anti-OM). Los resultados obtenidos junto con la optimización de la concentración del anti-OM se muestra en la Fig. 4.19.

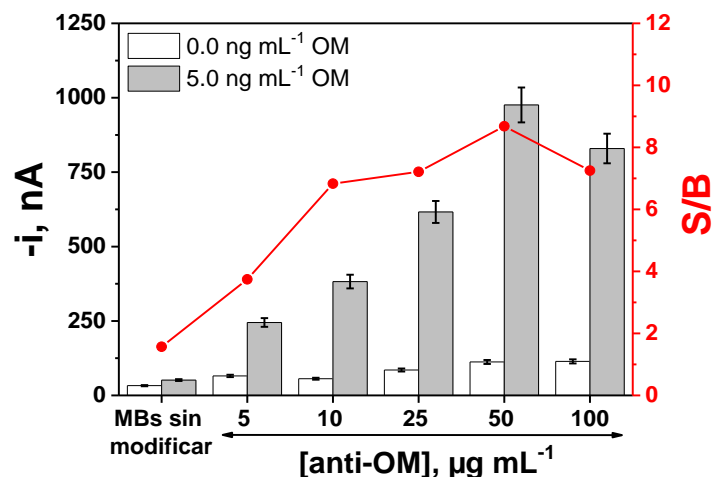


Fig. 4.19: Dependencia de los valores de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y presencia de 5.0 ng mL^{-1} de estándares de OM (S, barras grises) y la relación de señales resultante (S/B, línea roja) sobre MBs sin modificar o modificadas con diferentes concentraciones de anti-OM. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados mostrados en la Fig. 4.19 demuestran la obtención de respuestas amperométricas significativas en la detección de OM únicamente cuando se emplearon MBs modificadas con el anti-OM. Las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia ($(32 \pm 5) \text{ nA}$) y presencia de OM ($(51 \pm 8) \text{ nA}$) empleando MBs sin modificar, resultaron inferiores a la ordenada en el origen del calibrado obtenido para la determinación de estándares de OM con el inmunosensor desarrollado ($(95 \pm 14) \text{ nA}$, Tabla 4.9). Estos resultados demuestran la ausencia de adsorciones inespecíficas de los reactivos empleados sobre la superficie de las MBs sin modificar, y confirman la fiabilidad del inmunoensayo tipo sándwich para la determinación de OM.

Además, estos resultados (Fig. 4.19) demuestran un aumento más significativo de las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de OM que en su ausencia, y por consiguiente, una mayor relación S/B resultante, con la concentración de anti-OM hasta $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, concentración a partir de la cual se observa una disminución atribuible al impedimento estérico producido en el reconocimiento de la proteína diana cuando se inmovilizan grandes cantidades de anticuerpo de captura [Eletxigerra, 2016-a]. A la vista de estos resultados, se seleccionó una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-OM para la modificación de las MBs.

En la Tabla 4.9 se recogen los valores seleccionados como óptimos para la fabricación del inmunosensor de OM, tomando como criterio la mejor relación (S (5.0 ng mL⁻¹ de OM)/B) resultante. Otras variables involucradas en el proceso de detección amperométrica, como las concentraciones de H₂O₂ e HQ y el potencial de detección a aplicar (-0.20 V vs. electrodo de referencia de Ag/AgCl), se optimizaron en trabajos anteriores realizados en el Grupo de Investigación [Conzuelo, 2012-a], [Eguílaz, 2010], [Gamella, 2012].

Tabla 4.9. Variables experimentales optimizadas, intervalos evaluados y valores seleccionados como óptimos en el desarrollo de plataformas inmunosensoras amperométricas para la determinación de OM.

Variable experimental	Intervalo evaluado	Valor seleccionado
V _{HOOC-MBs} , µL	—	3 ^a
[anti-OM], µg mL ⁻¹	0.0 – 100.0	50
Tiempo de incubación del anti-OM, min	15 – 90	15
Dilución del anti-OM-HRP	1/100 – 1/10	1/25
Número de etapas	1 – 2	1
Tiempo de detección, min	15 – 90	30

^aCantidad de MBs optimizada en trabajos previos [Esteban-Fernández de Ávila, 2013].

A continuación, se describen y discuten brevemente los resultados obtenidos en las optimizaciones del número de etapas, suponiendo la incubación de los inmunocaptadores con la proteína diana y el anti-OM-HRP de forma conjunta (1 etapa) o en etapas secuenciales (2 etapas), y del tiempo de incubación de las anti-OM-MBs con la disolución mezcla de proteína diana y anti-OM-HRP.

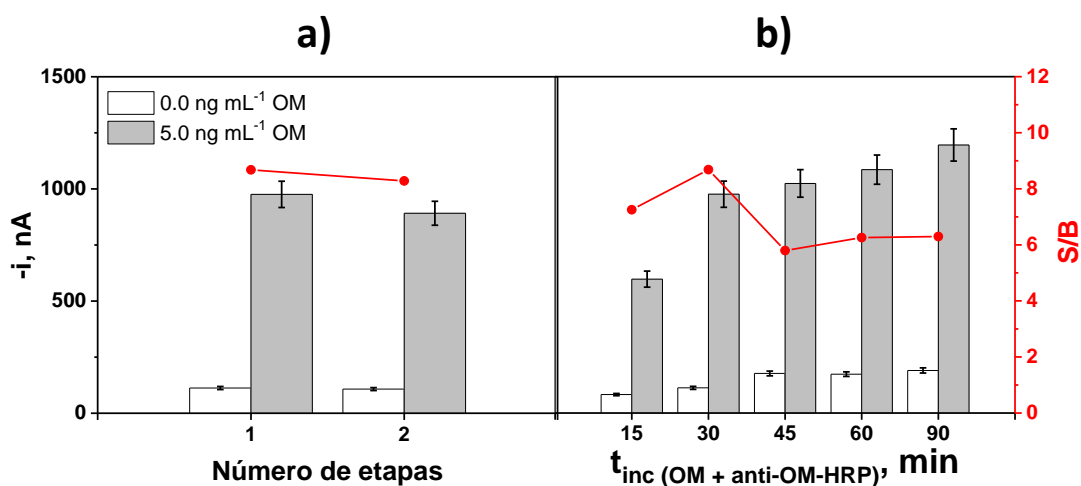


Fig. 4.20: Dependencia de los valores de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y presencia de estándares de 5.0 ng mL⁻¹ de OM (S, barras grises), y la relación de señales resultante (S/B, línea roja) con el número de etapas de incubación empleadas para la preparación de los inmunocomplejos tipo sándwich a) y con el tiempo de incubación de las anti-OM-MBs con la disolución mezcla que contiene la proteína diana y el anti-OM-HRP b). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos (Fig. 4.20 a) demuestran la ausencia de diferencias significativas entre la realización del inmunoensayo en 1 o 2 etapas. Estos resultados, junto con la simplificación y reducción del tiempo de ensayo, llevaron a seleccionar el protocolo en una única etapa para el desarrollo del inmunosensor. Por otro lado, aunque el tiempo óptimo de formación del inmunocomplejo fue de 30 min en una única etapa, en caso necesario, y con una pérdida de sensibilidad de un 40 %, se podría realizar la determinación en tan sólo 15 min.

Posteriormente a la optimización de todas las variables involucradas en la fabricación de la plataforma inmunosensora, se evaluaron sus características analíticas para la determinación amperométrica de estándares de OM construyéndose el calibrado que se muestra en la Fig. 4.21.

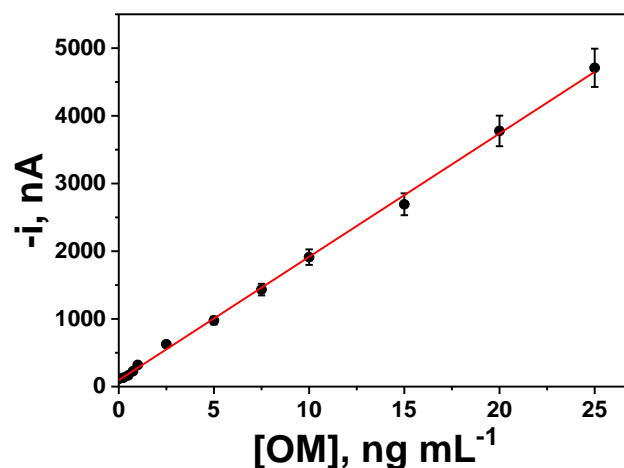


Fig. 4.21: Calibrado obtenido para la determinación amperométrica de estándares de OM con el inmunosensor desarrollado. Barras de error estimadas como tres veces de la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados obtenidos demuestran una dependencia lineal de las respuestas amperométricas con la concentración de estándar de OM en el intervalo de concentración comprendido entre (0.3–25) ng mL^{-1} ($r = 0.999$), con una pendiente de $(182 \pm 1) \text{ nA mL ng}^{-1}$ y una ordenada en el origen de $(95 \pm 14) \text{ nA}$. Los LD y LC, calculados a partir de la desviación estándar de 10 señales amperométricas obtenidas en ausencia de la proteína diana y la pendiente del calibrado mostrado en la Fig. 4.21, criterios $3 \times s_b/m$ y $10 \times s_b/m$, resultaron de 0.1 y 0.3 ng mL^{-1} , respectivamente.

Es importante destacar que el inmunosensor desarrollado proporciona un LD 610 veces inferior al ofrecido por el kit ELISA comercial que emplea los mismos inmunoreactivos (61 ng mL^{-1}) y en un tiempo de análisis 3 veces inferior (30 vs. 90 min). También se han descrito otras metodologías menos comunes, que emplean los mismos inmunoconjugados en tiras reactivas, que permiten la detección de OM en tan sólo 10 min, pero proporcionan un LD 10^4 veces mayor (1000 vs. 0.1 ng mL^{-1}). Resulta reseñable, además, que el LD alcanzado es 3 órdenes de magnitud inferior a los proporcionados por otros kits ELISA disponibles comercialmente para la determinación de OM, comprendidos entre (50–1000) ng mL^{-1} .

En el estudio de las características operacionales de la plataforma inmunosensora se evaluó la reproducibilidad para estándares de 5.0 ng mL^{-1} de OM, obteniéndose un valor de $\text{RSD} = 6.0 \%$, por comparación de las respuestas

amperométricas proporcionadas por ocho inmunosensores diferentes preparados de la misma manera.

También se evaluó la estabilidad de los inmunocaptadores almacenados a 4 °C en PBS filtrado, comparándose cada día de control la relación S (5.0 ng mL⁻¹ de OM)/B resultante empleando los inmunocaptadores almacenados, tomando como día 0 el día de su fabricación. Los resultados obtenidos, mostrados en la Fig. 4.22, confirman la fiabilidad y robustez de los protocolos empleados para la modificación de las MBs, así como su captura magnética sobre los SPCEs y transducción amperométrica, y la posibilidad de empleo de los inmunocaptadores magnéticos durante al menos 63 días (no se ensayaron tiempos superiores) sin pérdida significativa de sensibilidad, para la determinación de OM.

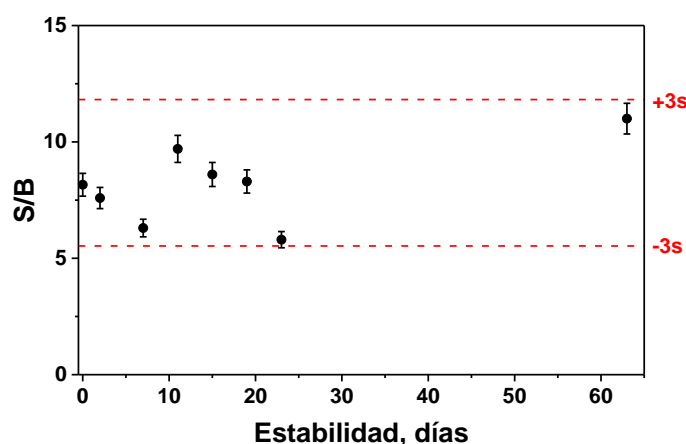


Fig. 4.22: Estabilidad de los inmunocaptadores preparados para la determinación de OM almacenados en PBS filtrado a 4 °C. Relación resultante (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas con las inmunoplateformas preparadas a partir de ellos, en ausencia (B) y presencia de 5.0 ng mL⁻¹ de estándares de OM (S). Gráfico de control construido tomando como valor medio la relación S/B obtenida para 10 inmunosensores preparados el primer día de estudio (día de preparación de los inmunocaptadores) y como límites superior e inferior +3s y -3s, respectivamente, de dicho valor medio, siendo “s” la desviación estándar que resulta para los 10 valores de S/B obtenidos. Barras de error estimadas como tres veces de la desviación estándar (n=3).

Las características analíticas y operacionales que proporciona la plataforma inmunosensora amperométrica desarrollada para la determinación de OM se recogen en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Características analíticas y operacionales obtenidas con la plataforma inmunosensora desarrollada para la determinación amperométrica de estándares de OM.

Parámetro	Valor
r	0.999
Pendiente, nA mL ng ⁻¹	(182 ± 1)
Ordenada en el origen, nA	(95 ± 14)
Intervalo lineal, ng mL ⁻¹	0.3 – 25.0
LD, ng mL ⁻¹	0.1 (2.5 pg)
LC, ng mL ⁻¹	0.3 (7.5 pg)
RSD _(n=8) , %	6.0
Estabilidad, días	63

La sencillez de la metodología desarrollada junto con la sensibilidad alcanzada para la determinación de la proteína diana, demuestra su elevado potencial para el desarrollo de metodologías fiables y de tiempo de análisis reducido que permitan la detección a niveles de traza de la presencia de huevo en matrices alimentarias complejas, a través de la determinación sensible y selectiva de OM. Estas metodologías resultarían competitivas para la determinación rutinaria y descentralizada de este alérgeno, en comparación con las metodologías ELISAs y espectrometría de masas, que requiere tediosos protocolos de reducción, carbametilación y digestión proteica de las muestras para su análisis, o técnicas basadas en PCR, que han demostrado problemas de selectividad hacia la carne de pollo en la determinación del OM y requieren instrumentación costosa disponible sólo en laboratorios centralizados [Mann, 2007], [Lee, 2010].

4.1.3.2. Evaluación de la selectividad

Con el fin de demostrar la aplicabilidad de la metodología desarrollada para la determinación de OM en el análisis de extractos alimentarios, se estudió, en primer lugar, la posible interferencia de otras proteínas no diana existentes en la clara de huevo. Para ello, se evaluaron las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 y

5.0 ng mL⁻¹ de OM preparados en ausencia y presencia de cada proteína. Estos estudios se realizaron teniendo en cuenta que los contenidos descritos de estas proteínas en clara de huevo son similares a los reportados para OM (conalbúmina, albúmina y riboflavina) o 1–2 órdenes de magnitud inferiores para lisozima y avidina, respectivamente [Abeyrathne, 2013].

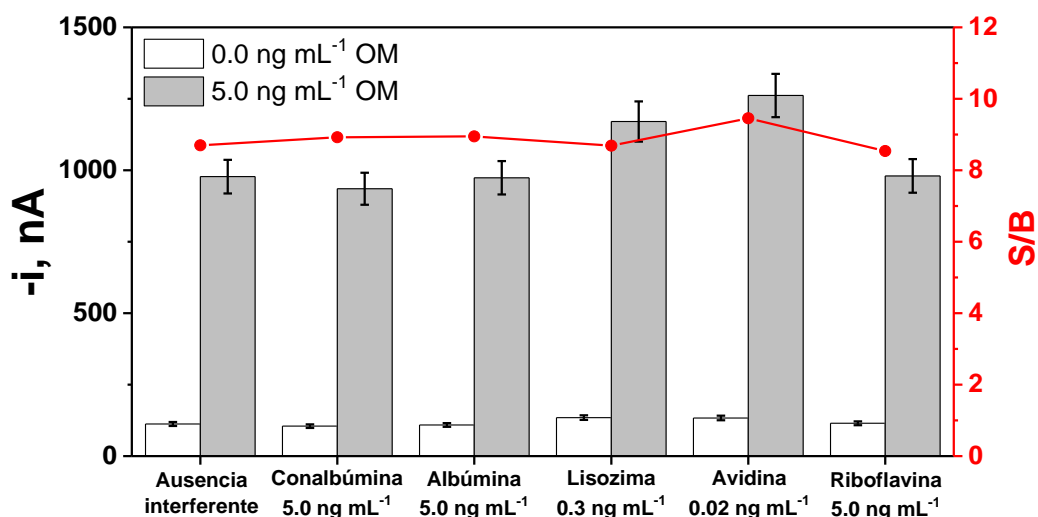


Fig. 4.23: Respuestas amperométricas obtenidas con la plataforma inmunosensora desarrollada para estándares de 0.0 (B, barras blancas) y 5.0 ng mL⁻¹ de OM (S, barras grises) preparados en ausencia o en presencia de 5.0 ng mL⁻¹ de conalbúmina y albúmina, 0.3 ng mL⁻¹ de lisozima, 0.02 ng mL⁻¹ de avidina o 5.0 ng mL⁻¹ de riboflavina. Barras de error estimadas como tres veces de la desviación estándar (n=3).

Las relaciones S/B obtenidas en la determinación de OM en presencia de cada interferente, mostrados en la Fig. 4.23, demuestran claramente que ninguna de las proteínas interfiere en su determinación a los niveles ensayados. Estos resultados confirman la elevada selectividad del anticuerpo empleado en la fabricación del inmunosensor y el potencial de la metodología desarrollada para la determinación selectiva de OM directamente en matrices alimentarias reales.

4.1.3.3. Aplicación al análisis de matrices alimentarias

La aplicabilidad de la metodología desarrollada se evaluó para la determinación del contenido endógeno de OM en extractos de huevo liofilizado y matrices alimentarias sin procesar (harina de trigo) o procesadas (pan horneado), libres y suplementadas con cantidades conocidas de huevo, siguiendo los protocolos descritos en los apartados 3.3.7.2 y 3.3.1 para su preparación y extracción, respectivamente. Los extractos resultantes se emplearon directamente para la determinación de OM, tras aplicar la dilución necesaria para ajustar su contenido al intervalo lineal de la plataforma inmunosensora desarrollada.

En primer lugar, se llevó a cabo la determinación del contenido endógeno de OM en extractos de huevo liofilizado. Es importante destacar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de las pendientes obtenidas para las curvas de calibrado construidas con estándares de OM preparados en la solución bloqueante de caseína o en extractos de huevo liofilizado (diluidos 250000 veces en solución bloqueante de caseína), resultando valores de (182 ± 1) y (189 ± 7) nA mL ng⁻¹, respectivamente. Estos resultados confirman la ausencia de efecto matriz y que la cuantificación del contenido de OM puede llevarse a cabo por simple interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para cada extracto en el calibrado obtenido para estándares (Fig. 4.21).

Los resultados obtenidos en el análisis de diferentes extractos de huevo liofilizado, (diluidos 250000 veces con solución bloqueante de caseína) proporcionaron un porcentaje de OM en huevo de (2.86 ± 0.05) % (p/p) ($RSD_{(n=5)} = 1.3$ %), resultado que está de acuerdo con el contenido descrito en la literatura [Kovacs-Nolan, 2005].

Debido a la elevada estabilidad térmica del OM [Honma, 1991], este puede encontrarse en alimentos procesados como el pan. Por ello, se estudió la influencia de la temperatura en las respuestas amperométricas obtenidas con la inmunoplateforma desarrollada llevando a cabo un tratamiento térmico a 95 °C durante 75 min en muestras de huevo liofilizado y pan suplementado con 5000 o 2.5 mg Kg⁻¹ de huevo. Los extractos resultantes sin diluir (pan con 2.5 mg Kg⁻¹ de huevo) o diluidos 250000 (huevo liofilizado) y 3000 veces (pan con 5000 mg Kg⁻¹ de huevo) se emplearon directamente para el análisis.

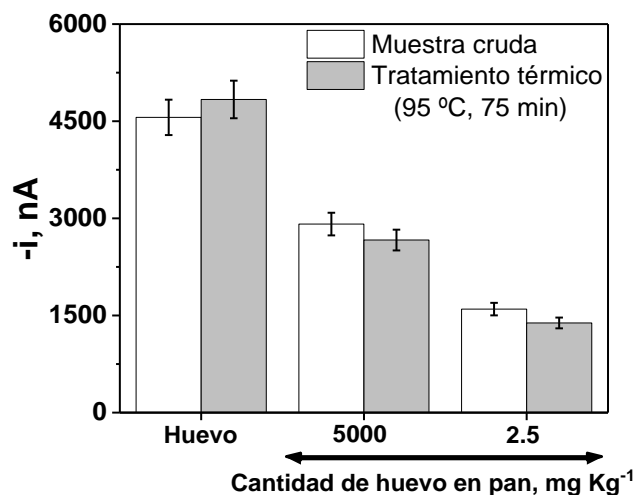


Fig. 4.24: Comparación de las respuestas amperométricas proporcionadas por el inmunosensor en el análisis de los extractos obtenidos a partir de muestras de huevo liofilizado y pan, crudas o procesadas a 95 °C durante 75 min sin diluir (pan suplementado con 2.5 mg Kg⁻¹ de huevo) o diluidos 1/250000 y 1/3000 (huevo liofilizado y muestras de pan suplementado con 5000 mg Kg⁻¹ de huevo, respectivamente). Barras de error estimadas como tres veces de la desviación estándar (n=3).

Los resultados obtenidos demuestran la ausencia de diferencias significativas en la detección de OM empleando la plataforma inmunosensora, antes y después del tratamiento (95 °C durante 75 min), lo que confirma la estabilidad térmica del OM y su determinación con la inmunoplateforma en alimentos procesados.

Con el fin de evaluar la sensibilidad real de la metodología en la determinación directa de huevo a niveles de traza mediante la detección de OM, se analizaron muestras de harina de trigo y pan horneado suplementadas a niveles de traza con huevo liofilizado. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.25.

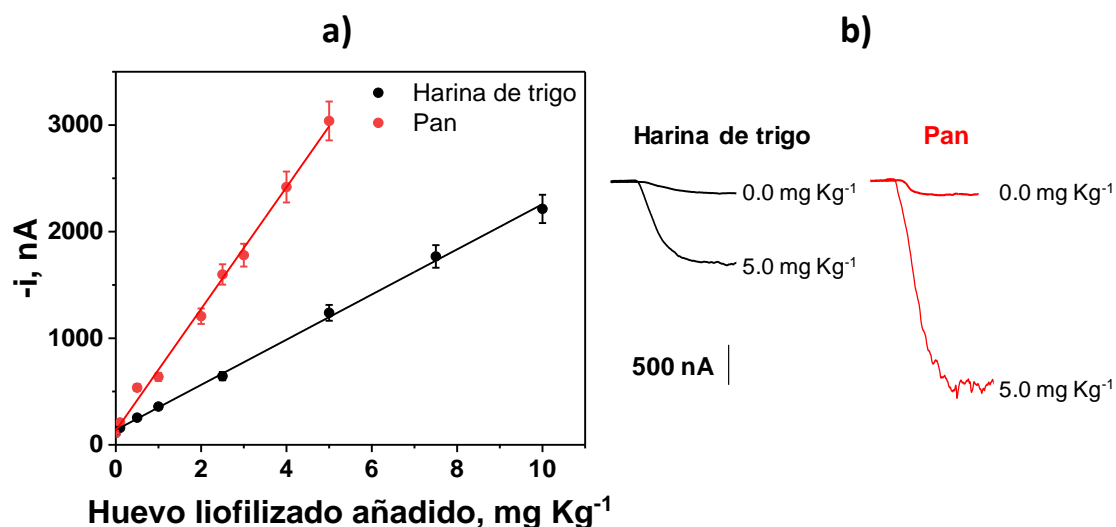


Fig. 4.25: Calibrados obtenidos con la plataforma inmunosensora desarrollada en la determinación de huevo, a partir de la detección de OM, en el análisis de extractos preparados a partir de muestras de harina de trigo y pan, libres o suplementadas a niveles de traza con huevo liofilizado. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$) a). Amperogramas obtenidos en el análisis de extractos de muestras de harina de trigo y pan suplementadas con 0.0 y 5.0 mg Kg⁻¹ de huevo liofilizado b).

Como se observa en la Fig. 4.25, existe una dependencia lineal de las respuestas amperométricas con la cantidad de huevo liofilizado presente, en el intervalo comprendido entre (0.6–10) ($r = 0.999$) y (0.4–5) mg Kg⁻¹ ($r = 0.998$), con pendientes de (212 ± 3) y (571 ± 14) nA Kg mg⁻¹ para las muestras de harina de trigo y pan, respectivamente. También se estimaron los valores de los LD y LC que proporciona la plataforma inmunosensora desarrollada en la determinación directa en matrices alimentarias, a partir de la desviación estándar de 10 señales amperométricas obtenidas para extractos de harina de trigo y pan (libres de OM) y las pendientes de los calibrados mostrados en la Fig. 4.25.

Tabla 4.11. Características analíticas obtenidas con la plataforma inmunosensora desarrollada en la determinación de huevo, a partir de la detección de OM, en el análisis de extractos de muestras de harina de trigo y pan suplementadas con huevo liofilizado.

Parámetro	Harina de trigo	Pan
r	0.999	0.998
Pendiente, nA Kg mg ⁻¹	(212 ± 3)	(571 ± 14)
Ordenada en el origen, nA	(139 ± 16)	(134 ± 35)
Intervalo lineal, mg Kg ⁻¹	0.6 – 10.0	0.4 – 5.0
LD, mg Kg ⁻¹	0.17	0.13
LC, mg Kg ⁻¹	0.6	0.4

Los LDs obtenidos (Tabla 4.11) demuestran una sensibilidad 4000 veces superior a los kits ELISA comerciales que permiten la detección de 500 mg Kg⁻¹ de huevo en muestras de pan, siendo también inferiores a los niveles que se consideran de relevancia en la determinación de alérgenos no declarados en alimentos, de 10 mg Kg⁻¹ [Luis, 2008], [López-Calleja, 2007]. La buena sensibilidad obtenida en la identificación de trazas de huevo puede atribuirse tanto a la elevada afinidad del anticuerpo seleccionado, como al empleo de MBs en la construcción de inmunosensores, que mejora la eficiencia y acelera la cinética de las reacciones de afinidad, permitiendo el desarrollo de biosensores más sensibles y menos susceptibles a efectos de la matriz en muestras complejas.

Teniendo en cuenta el porcentaje de (2.86 ± 0.05) % de OM presente en el huevo liofilizado empleado para suplementar las muestras de harina de trigo y pan, los LDs encontrados (0.17 y 0.13 mg Kg⁻¹, Tabla 4.11) corresponderían a concentraciones de 0.49 y 0.37 ng mL⁻¹ de la proteína diana, respectivamente. Estos valores son del mismo orden de magnitud que el obtenido en solución bloqueante de caseína (LD: 0.1 ng mL⁻¹, Tabla 4.10), confirmando así la aplicabilidad de la metodología desarrollada en la determinación de OM, independientemente del tipo de muestra o el procesamiento aplicado.

4.1.3.4. Simplificación de la metodología desarrollada

Una vez demostrada la versatilidad y el potencial de la plataforma inmunosensora en el análisis directo de OM, se evaluó la posibilidad de simplificar todavía más y reducir el tiempo de ensayo, empleando directamente los inmunocaptadores desarrollados para la extracción selectiva de la proteína diana directamente de las matrices alimentarias. Para ello, se llevó a cabo la extracción y captura de OM en una misma etapa, lo que supone la incubación de estos inmunocaptadores en muestras turbias con gran contenido de materia sólida en suspensión, aprovechando las propiedades magnéticas de los inmunocaptadores para el aislamiento de la proteína diana. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.26.

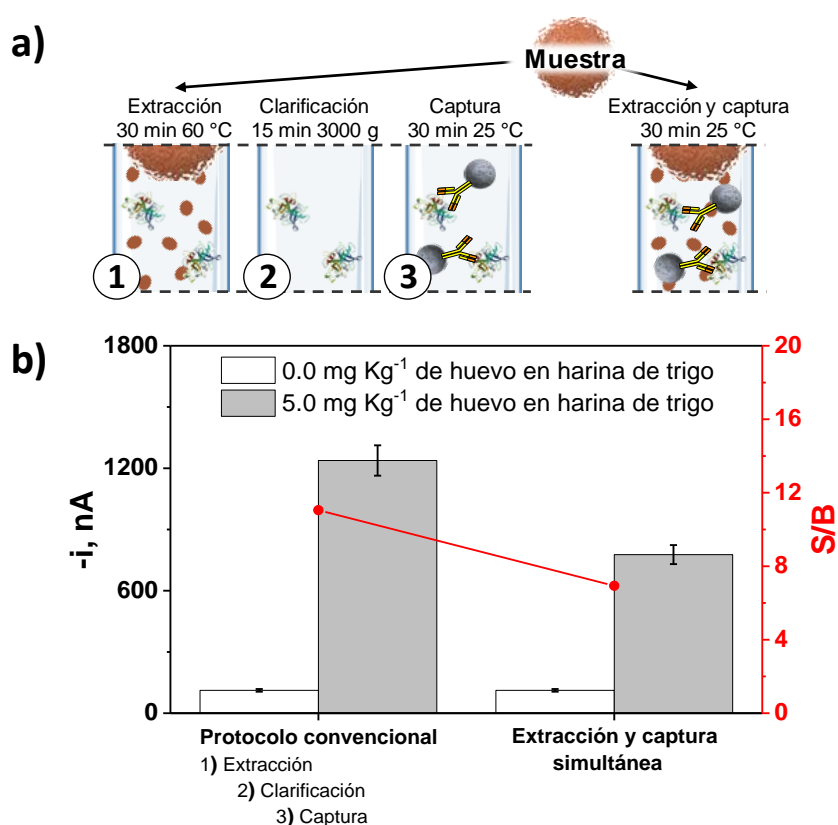


Fig. 4.26: Diagrama esquemático a) y comparación de las respuestas amperométricas proporcionadas por el inmunosensor para OM en el análisis de muestras de harina de trigo libres y suplementadas con 5.0 mg Kg⁻¹ de huevo liofilizado, empleando el protocolo convencional, basado en la realización secuencial de la extracción, clarificación y captura de OM en los extractos clarificados, o llevando a cabo la extracción/captura de OM directamente de las matrices alimentarias pulverizadas en el tampón empleado para la extracción b). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados obtenidos demuestran, como era de esperar, una disminución de la relación S/B resultante cuando se emplea el protocolo simplificado de extracción y captura simultánea. Sin embargo, cabe destacar que, aunque con una sensibilidad inferior, las respuestas amperométricas obtenidas con el protocolo simplificado para muestras de harina de trigo libre y suplementadas con 5 mg Kg⁻¹ de huevo, también resultan suficientemente diferentes y reproducibles para discriminar, de forma inequívoca, la presencia de OM a niveles de trazas.

Los resultados mostrados abren nuevas posibilidades en la aplicación de estos inmunocaptadores para evaluar el potencial y estabilidad de las proteínas de interés directamente en el medio de extracción, independientemente de su complejidad o de la presencia de materia sólida en suspensión, lo que conlleva una simplificación de la metodología desarrollada en la determinación de la presencia de huevo a niveles de traza. Resulta destacable, además, que la aplicabilidad demostrada en el análisis directo de muestras turbias no se ha explorado hasta la fecha empleando la metodología ELISA convencional, debido, esencialmente, a la incompatibilidad de realizar la detección óptica en este tipo de matrices.

4.2. Plataformas inmunosensoras electroquímicas para la multideterminación de marcadores proteicos de alérgenos y fraudes alimentarios

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo de plataformas inmunosensoras amperométricas, basadas en el empleo de HOOC-MBs en la fabricación de inmunosensores tipo sándwich, para la determinación simultánea de las principales proteínas alergénicas presentes en el cacahuete (Ara h 1 y Ara h 2), empleando SPdCE y determinación multiplexada de adulteraciones en productos lácteos, con leche de vaca, oveja, cabra y calostro, empleando SPC4Es.

4.2.1. Plataforma inmunosensora dual para la determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2

En este apartado se discuten los resultados más relevantes del artículo: *Ruiz-Valdepeñas Montiel et al. Simultaneous determination of the main peanut allergens in foods using disposable amperometric magnetic beads-based immunosensing platforms. Chemosensors 4(3) (2016) 11*, aportado como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

Como se ha comentado en el apartado 4.1.2, el cacahuete es uno de los frutos secos con mayor potencial alergénico, considerándose el principal responsable de las muertes causadas por alergia alimentaria. Teniendo en cuenta que alrededor de un 65 y 71 % de la población sensibilizada contra el cacahuete presenta IgEs específicos para las proteínas Ara h 1 y Ara h 2, respectivamente [Koppelman, 2001], en este apartado se van a integrar los inmunosensores desarrollados en el apartado 4.1.2 para la determinación individual, en una única plataforma inmunosensora que permita la determinación simultánea de estas dos proteínas alergénicas en el mismo ensayo, con el fin de detectar, de manera más eficiente, la presencia de cacahuete a niveles de traza en matrices complejas.

La metodología propuesta se basa en la preparación simultánea de dos lotes de MBs modificadas con inmunocomplejos tipo sándwich para la determinación de Ara h 1 y Ara h 2. Para ello, se preparan inmunocaptadores, para el reconocimiento selectivo de ambas proteínas, modificando específicamente las MBs con cada anticuerpo de captura (anti-Ara h 1-MBs o anti-Ara h 2(C)-MBs). Los estándares o muestras se incuban con cada tipo de inmunocaptor por separado, llevándose a cabo la formación de los inmunocomplejos tipo sándwich y su marcaje enzimático posterior mediante su incubación secuencial con el anticuerpo de detección (b-anti-Ara h 1 o anti-Ara h 2(D)), y el trazador enzimático correspondiente (Estrep-HRP o F(ab')₂-HRP, para la determinación de Ara h 1 y Ara h 2, respectivamente). Las MBs modificadas con los inmunocomplejos tipo sándwich de cada una de las proteínas diana se capturaron magnéticamente de forma independiente sobre la superficie de los electrodos de trabajo (W1 para Ara h 1 y W2 para Ara h 2) de electrodos serigrafiados de carbono duales (SPdCEs) y se monitorizaron las variaciones catódicas debidas a la reducción enzimática del H₂O₂ en presencia de HQ obtenidas sobre ambos electrodos.

Los fundamentos de la plataforma inmunosensora dual desarrollada para la determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2 se muestran en la Fig. 4.27.

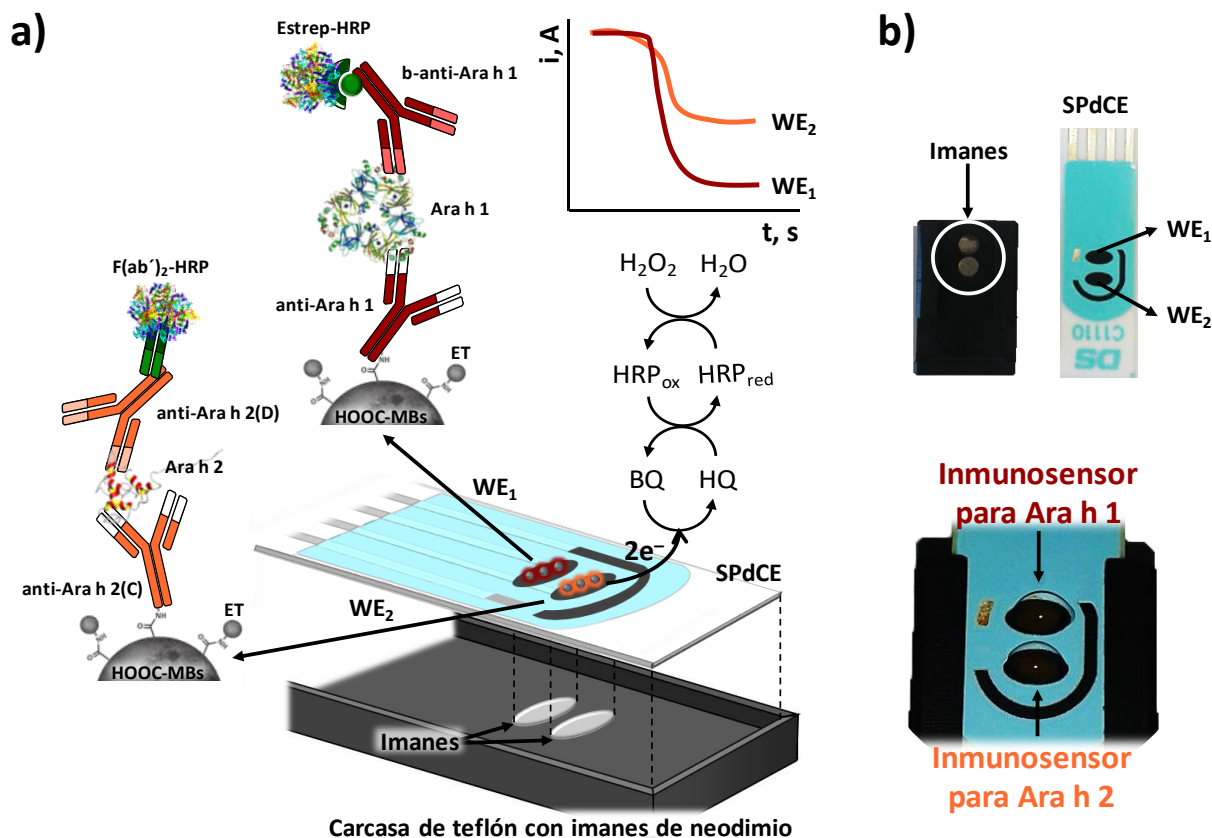


Fig. 4.27: a) Diagrama esquemático de la plataforma inmunosensora dual desarrollada para la determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2: disposición de las MBs modificadas con los inmunocomplejos tipo sándwich en cada electrodo de trabajo del SPdCE y reacciones enzimáticas implicadas en la detección amperométrica de la reducción enzimática del H_2O_2 mediada por HQ. b) Imágenes reales de la carcasa de teflón provista de dos imanes de neodimio y el SPdCE y captura magnética de las MBs modificadas empleando el conjunto SPdCE-carcasa.

4.2.1.1. Determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2

El desarrollo de la plataforma inmunosensora dual para la determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2 se llevó a cabo a partir de los inmunosensores desarrollados para la determinación individual en el apartado 4.1.2. Para ello, se empleó un protocolo de fabricación análogo para ambos lotes de inmunosensores. Teniendo en cuenta la mayor sensibilidad alcanzada en la determinación individual de Ara h 2 ($LD = 0.026 \text{ ng mL}^{-1}$) en comparación con Ara h 1 ($LD = 6.3 \text{ ng mL}^{-1}$) y con el fin de facilitar la integración de ambas metodologías, se decidió realizar la inmovilización covalente de los anticuerpos de captura durante 30 min y la formación de los inmunocomplejos en 3

etapas (protocolo de fabricación óptimo para la determinación de Ara h 1), comprometiéndose así, en mayor medida, la sensibilidad en la determinación dual de Ara h 2. Las variables empleadas en la determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2 se recogen en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12. Variables experimentales seleccionadas para el desarrollo de plataformas inmunosensoras amperométricas para la determinación individual o simultánea de Ara h 1 y Ara h 2.

Variable experimentales seleccionadas	Determinación individual		Determinación dual	
	Ara h 1	Ara h 2	Ara h 1	Ara h 2
$V_{\text{HOOC-MBs}}$, μL	3 ^a	3 ^a	3	
[anti-(Ara h 1 o 2(C))], $\mu\text{g mL}^{-1}$	25.0	50.0	25.0	50.0
Tiempo de incubación del anti-(Ara h 1 o 2(C)), min	30	15	30	
Factor de dilución del b-anti-Ara h 1 o anti-Ara h 2(D)	1/10000	1/1000	1/10000	1/1000
Dilución Strep-HRP	1/1000 ^a	—	1/1000 ^a	—
Dilución F(ab') ₂ -HRP	—	1/10000	—	1/10000
Número de etapas	3	2	3	
Tiempo de incubación de la proteína diana, min	45	45	45	
Tiempo de incubación del b-anti-Ara h 1 o anti-Ara h 2(D), min	45		45	
Tiempo de incubación del marcaje enzimático	30 ^a	30	30	

La posible existencia de reactividad cruzada entre los inmunoreactivos empleados en la determinación específica de Ara h 1 y Ara h 2, así como la difusión de las especies electroactivas involucradas entre los electrodos adyacentes (W1 y W2), son las principales dificultades que deben evaluarse en el desarrollo de plataformas inmunosensoras de multiplexado. Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas con la plataforma inmunosensora dual en la determinación de

mezclas que contenían diferentes concentraciones de Ara h 1 y/o Ara h 2. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.28.

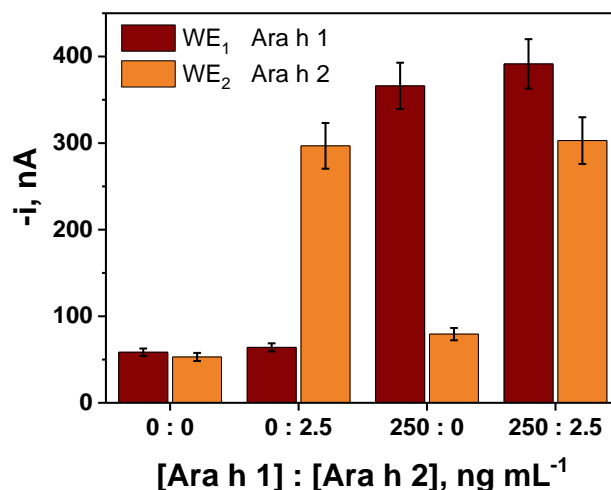


Fig. 4.28: Respuestas amperométricas obtenidas con la plataforma inmunosensora dual desarrollada en el análisis simultáneo de mezclas que contenían: 0.0:0.0, 0.0:2.5, 250:0.0 y 250:2.5 ng mL⁻¹ de estándares de Ara h 1:Ara h 2, respectivamente. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Como puede observarse, no existen diferencias apreciables entre las intensidades de corriente registradas en presencia o ausencia de Ara h 1 y/o Ara h 2 en las distintas mezclas evaluadas, demostrando la ausencia, tanto de reactividad cruzada entre las proteínas evaluadas, como de procesos de difusión entre electrodos adyacentes, y por tanto, la validez de la plataforma inmunosensora para la determinación de ambos alérgenos de forma conjunta.

Posteriormente se evaluaron las características analíticas mediante la construcción de los calibrados que se muestran en la Fig. 4.29 para concentraciones crecientes de estándares de Ara h 1 y Ara h 2, preparados en solución bloqueante de caseína.

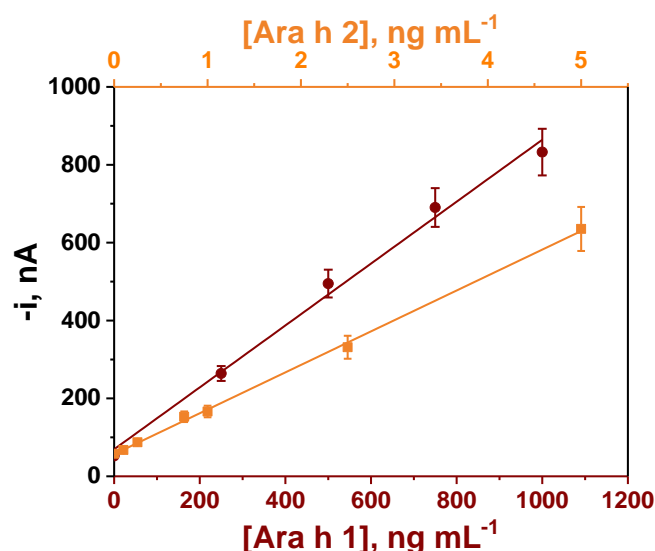


Fig. 4.29: Rectas de calibrado obtenidas en la determinación simultánea de estándares de Ara h 1 (●) y Ara h 2 (■) con la plataforma inmunosensora dual desarrollada. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Como puede observarse, existe una dependencia lineal de las respuestas amperométricas obtenidas con las concentraciones de estándares de Ara h 1 y Ara h 2, en los intervalos de concentraciones comprendidos entre (60–1000) y (0.25–5.0) ng mL⁻¹ para Ara h 1 y Ara h 2, respectivamente.

La reproducibilidad de la plataforma inmunosensora dual desarrollada se evaluó para la determinación de disoluciones mezcla de 500.0 y 1.0 ng mL⁻¹ de estándares de Ara h 1 y Ara h 2, respectivamente. Los valores de $RSD_{(n=8)}$ obtenidos, de 7.3 y 8.9 %, respectivamente, confirman la robustez de los protocolos empleados, tanto para la modificación de las MBs como para realizar la transducción amperométrica empleando SPdCEs.

A continuación, se recogen las características analíticas y operacionales obtenidas con la plataforma inmunosensora dual desarrollada para la determinación amperométrica de estándares de Ara h 1 y Ara h 2.

Tabla 4.13. Características analíticas y operacionales obtenidas con las plataformas inmunosensoras duales para la determinación simultánea de estándares de Ara h 1 y Ara h 2.

Parámetros	Plataforma inmunosensora dual	
	Ara h 1	Ara h 2
r	0.996	0.999
Pendiente, nA mL ng ⁻¹	(0.79 ± 0.05)	(115 ± 2)
Ordenada en el origen, nA	(130 ± 13)	(87 ± 8)
Intervalo lineal, ng mL ⁻¹	60.0 – 1000.0	0.25 – 5.0
LD, ng mL ⁻¹	18 (450 pg)	0.07 (1.8 pg)
LC, ng mL ⁻¹	60.0 (1500 pg)	0.25 (6.3 pg)
RSD _(n=8) , %	7.3 (500.0 ng mL ⁻¹)	8.9 (1.0 ng mL ⁻¹)
Estabilidad, días	25*	50*

*Estabilidad evaluada en el apartado 4.1.2.

En este punto cabe destacar que los LDs calculados (Tabla 4.13) son ligeramente superiores a los obtenidos con las inmunoplateformas desarrolladas para la determinación individual de cada proteína (6.3 y 0.026 ng mL⁻¹ para Ara h 1 y Ara h 2, respectivamente). Estos resultados pueden atribuirse a la menor superficie activa de los electrodos de trabajo de los SPdCEs en comparación con el de los SPCE (6.3 vs. 12.6 mm²). Sin embargo, es importante destacar que los valores que proporciona la plataforma inmunosensora dual demostraron ser suficientes para la determinación de estas proteínas del cacahuete a los niveles relevantes (ng mL⁻¹), desde el punto de vista clínico, para la iniciación de reacciones alérgicas graves [Elaine, 2016]. También es importante señalar que los LDs logrados son mejores que los proporcionados por los kits ELISAs comerciales para la detección individual de Ara h 1 o Ara h 2 (31.5 y 2.0 ng mL⁻¹, respectivamente) y que emplean los mismos inmunoreactivos que la plataforma dual desarrollada.

4.2.1.2. Evaluación de interferencias

La selectividad de la plataforma inmunosensora dual desarrollada se evaluó para la determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2 en presencia de proteínas no dianas, como BSA, OVA o lisozima, presentes en las matrices alimentarias a analizar. Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de estándares y para mezclas que contenían 500 y 1.0 ng mL⁻¹ de estándares de Ara h 1 y Ara h 2, respectivamente, preparadas en ausencia o presencia de cada interferente en la concentración en la que se encuentran habitualmente en las muestras de interés.

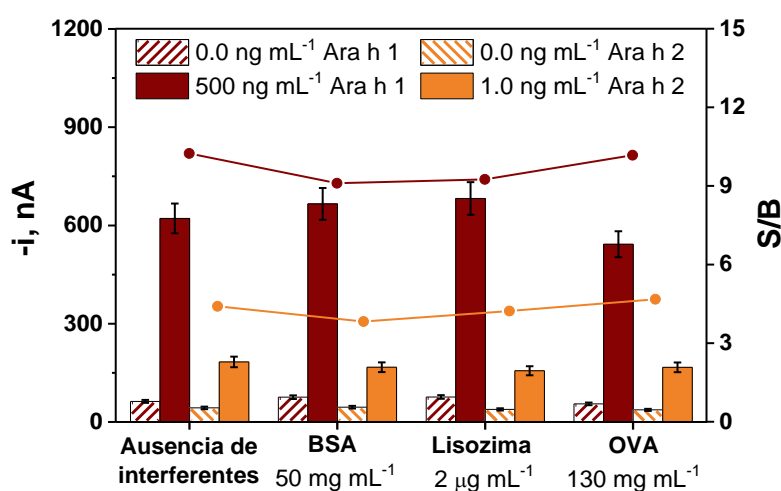


Fig. 4.30: Respuestas amperométricas obtenidas con la plataforma inmunosensora dual desarrollada en el análisis de mezclas que contenían 0.0 (barras blancas rayadas en granate para Ara h 1 y rayadas en naranja para Ara h 2) o 500 (barras granate) y 1.0 ng mL⁻¹ (barras naranjas) de estándares de Ara h 1 y Ara h 2, respectivamente, y la relación resultante S/B (líneas granate o naranja para Ara h 1 o Ara h 2, respectivamente) preparadas en ausencia o en presencia de 50 mg mL⁻¹ de BSA, 2 µg mL⁻¹ de lisozima o 130 mg mL⁻¹ de OVA. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados mostrados en la Fig. 4.30 demuestran que ninguna de las proteínas ensayadas a las concentraciones indicadas interfiere significativamente en la determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2 con la metodología desarrollada, lo que permite su aplicación directa al análisis de extractos alimentarios reales sin necesidad de aplicar etapas de pretratamiento adicionales a la muestra.

4.2.1.3. Determinación de Ara h 1 y Ara h 2 en matrices alimentarias

La aplicabilidad de la plataforma inmunosensora dual desarrollada se evaluó para la determinación del contenido endógeno de Ara h 1 y Ara h 2 en diversos extractos alimentarios: cacahuets fritos o crudos, barras de chocolate con cacahuets tostados, crema de cacahuete, avellanas crudas, y harina de trigo. La ausencia de efecto matriz en todas estas determinaciones se demostró comparando las pendientes de los calibrados construidos con estándares de Ara h 1 y Ara h 2 (hasta 750.0 o 2.5 ng mL⁻¹, respectivamente) en solución bloqueante de caseína (Fig. 4.29), o en los extractos alimentarios sin diluir o diluidos 50 o 500000 veces (según se indica en la Tabla 4.14). Teniendo en cuenta estos resultados, la determinación del contenido endógeno de ambas proteínas se realizó mediante interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para cada uno de los extractos diluidos en los calibrados obtenidos para estándares de Ara h 1 y Ara h 2 (Fig. 4.29), obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14: Contenidos de Ara h 1 y Ara h 2 (en mg g⁻¹) determinados en los extractos alimentarios que se indican con la plataforma desarrollada para la determinación dual y con los dos kits ELISAs comerciales para la determinación individual de cada una de las proteínas diana.

Extractos analizados	[Ara h 1], mg g ⁻¹			[Ara h 2], mg g ⁻¹		
	Factor de dilución	Plataforma dual	ELISA para Ara h 1	Factor de dilución	Plataforma dual	ELISA para Ara h 2
Cacahuete frito	1/1000	(7 ± 2)	(7.3 ± 0.6)	1/250000	(3.6 ± 0.8)	(3.4 ± 0.6)
Cacahuete crudo	1/1000	(2.3 ± 0.4)	(2.8 ± 0.3)	1/250000	(3.8 ± 0.3)	(4.1 ± 0.5)
Barritas de chocolate y cacahuete tostado	1/50	(0.18 ± 0.01)	(0.18 ± 0.03)	1/25000	(0.23 ± 0.05)	(0.30 ± 0.08)
Crema de cacahuete 1	1/50	(1.9 ± 0.2)	(1.8 ± 0.4)	1/500000	(4.5 ± 0.8)	(4.3 ± 0.8)
Avellana cruda	–	< LD	< LD	–	< LD	< LD
Harina de cacahuete	–	< LD	< LD	–	< LD	< LD

Los resultados obtenidos se correlacionaron satisfactoriamente con los proporcionados por kits ELISAs que emplean los mismos inmunoreactivos (Tabla 4.14), obteniéndose valores para las pendientes y las ordenadas en el origen que incluyen el 1 y el 0, respectivamente, para Ara h 1: (1.03 ± 0.06) ($r = 0.994$), (-0.1 ± 0.3) , y para Ara h 2: (1.02 ± 0.08) ($r = 0.991$), (-0.06 ± 0.3) . Además, los valores de $RSD_{(n=3)}$ obtenidos están comprendidos entre 2.3–9.6 % y 3.4–10.5 % empleando la plataforma dual desarrollada y la metodología convencional ELISA, respectivamente. Estos resultados confirman la ausencia de errores sistemáticos en la determinación simultánea de las principales proteínas alergénicas presentes en el cacahuete, y la gran selectividad de la plataforma dual desarrollada frente a otros frutos secos o cereales en el análisis directo de sus extractos crudos sin diluir.

De forma análoga a los estudios realizados en los apartados 4.1.2.3 y 4.1.2.4, la elevada sensibilidad demostrada por esta plataforma para la determinación simultánea, hace especialmente interesante su aplicación al análisis directo de trazas de cacahuete en matrices alimentarias complejas. Por ello, se evaluó su aplicabilidad para la determinación simultánea de Ara h 1 y Ara h 2 en muestras de harina de trigo (libres de Ara h 1 y Ara h 2) contaminadas con cantidades crecientes de harina de cacahuete. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.31.

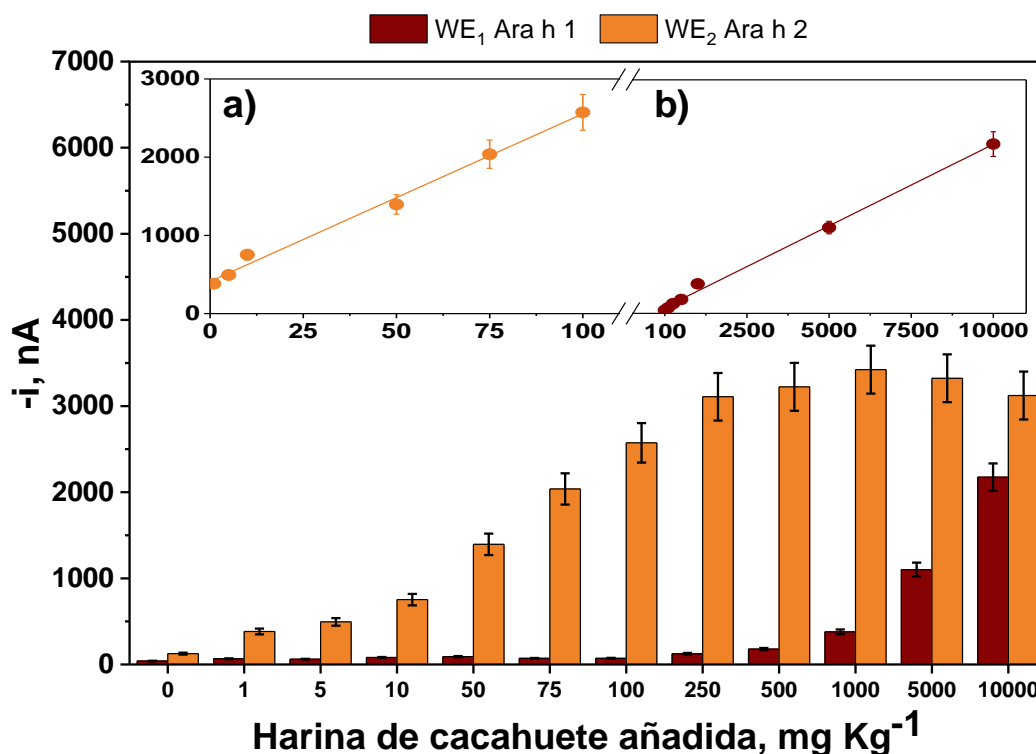


Fig. 4.31. Respuestas amperométricas obtenidas con las plataformas inmunosensoras duales para la determinación simultánea de Ara h 1 (barras grises) y Ara h 2 (barras naranjas) en extractos de harina de trigo (libres de cacahuete) sin suplementar y suplementadas con harina de cacahuete, en el intervalo comprendido entre (1.0–10000) mg Kg⁻¹, y regresiones lineales obtenidas entre las respuestas amperométricas y la cantidad de harina de cacahuete comprendidas entre 1.0–100 mg Kg⁻¹ para Ara h 2 (a) y 100–10000 mg Kg⁻¹ para Ara h 1 (b). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar (n = 3).

Los resultados obtenidos (Fig. 4.31) demuestran la posibilidad de detectar la presencia de tan solo 1.0 mg Kg⁻¹ de cacahuete en esta matriz alimentaria, confirmando de nuevo las excelentes sensibilidades que proporcionan, tanto la plataforma individual para Ara h 2 (4.1.2.4), como la plataforma dual desarrollada. Es importante destacar que estas plataformas mejoran entre 500–1000 veces los niveles detectables (500–1000 mg Kg⁻¹) descritos en la literatura empleando otros inmunosensores electroquímicos [Alves, 2015-a], [Alves, 2015-b], y son del mismo orden que los descritos empleando estrategias de amplificación por PCR (2.0–10 mg kg⁻¹) [Lopez-Calleja, 2013], [Watanabe, 2006], [Scaravelli, 2008], [Köppel, 2010].

Los resultados obtenidos demuestran, además de la detección de cacahuete a niveles de traza, la posibilidad de cuantificar su contenido en un amplio intervalo lineal

comprendido entre (1.0–100) y (100–10000) mg Kg⁻¹, a través de la detección de Ara h 2 y Ara h 1, respectivamente (características analíticas recogidas en la Tabla 4.15).

Tabla 4.15. Características analíticas obtenidas con las plataformas inmunosensoras duales para la determinación de cacahuete a partir de la detección simultánea de Ara h 1 y Ara h 2 en el análisis directo de los extractos resultantes de muestras de harina de trigo suplementadas con cantidades crecientes de harina de cacahuete.

Parámetros	Plataforma inmunosensora dual	
	Cacahuete a partir de la detección de Ara h 1 (Fig. 4.31, b)	Cacahuete a partir de la detección de Ara h 2 (Fig. 4.31, a)
r	0.998	0.996
Pendiente, nA Kg mg ⁻¹	(0.209 ± 0.005)	(21 ± 1)
Ordenada en el origen, nA	(77 ± 21)	(412 ± 56)
Intervalo lineal, mg Kg ⁻¹	100.0 – 10000.0	1.0 – 100.0

En este punto, cabe destacar, que la posibilidad de cuantificar la cantidad de cacahuete en un intervalo lineal de 4 órdenes de magnitud, (1.0–10000) mg Kg⁻¹, permite el empleo de la plataforma inmunosensora dual desarrollada, tanto para el análisis directo de trazas de cacahuete, como para la determinación en muestras con contenido variable, sin la necesidad de aplicar distintas diluciones de la muestra, lo que simplifica los protocolos de análisis y reduce en gran medida la posibilidad de obtener falsos positivos. Es importante destacar que el análisis simultáneo de ambas proteínas alergénicas mejora además la fiabilidad de la detección. Todos estos resultados dotan a la plataforma desarrollada de propiedades únicas para la identificación directa, reproducible y fiable de cacahuete o derivados en matrices alimentarias.

Teniendo en cuenta la versatilidad de la plataforma dual desarrollada, se evaluó la posibilidad de reducir el tiempo de ensayo, simplificando al máximo el tratamiento de muestra. Para ello, se aplicó la metodología desarrollada al análisis de extractos alimentarios, obtenidos de muestras de harina de trigo suplementadas con cacahuete, preparados siguiendo el protocolo convencional (1) y omitiendo las etapas de centrifugación (3, muestra turbia) o sustituyéndolas por un simple proceso de

decantación natural durante 30 min (2). Los resultados obtenidos se comparan en la Fig. 4.32.

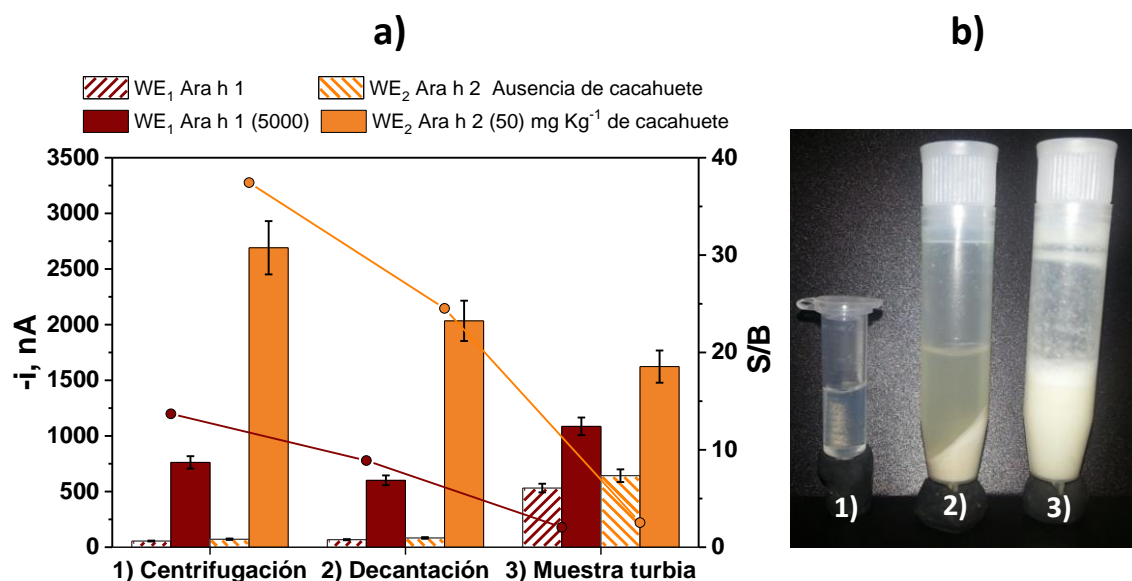


Fig. 4.32: a) Respuestas amperométricas obtenidas con las inmunoplateformas duales desarrolladas en el análisis de extractos obtenidos de muestras de harina de trigo sin suplementar (barras blancas rayadas en granate o naranja para Ara h 1 o Ara h 2, respectivamente) y suplementadas con 50 (barras naranjas para Ara h 2) o 5000 mg Kg⁻¹ (barras granate para Ara h 1) de harina de cacahuete, y relación S/B (líneas granate o naranja para Ara h 1 o Ara h 2, respectivamente), preparados siguiendo el protocolo convencional (1), sustituyendo las etapas de centrifugación por un proceso de decantación natural durante 30 min (2) o directamente en los extractos turbios que resultan sin emplear etapas de centrifugación (3). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$). b) Imagen real de los extractos empleados para el análisis.

Los resultados obtenidos demuestran, como era de esperar, una disminución de la relación S/B a medida que se simplifica el tratamiento aplicado al extracto, obteniéndose un aumento significativo de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de cacahuete para las muestras turbias (Fig. 4.32, 3), que puede atribuirse al aumento de adsorciones inespecíficas de la materia en suspensión sobre la superficie de las MBs. Es importante destacar que, pese a la disminución en la relación S/B, resultaba posible la identificación inequívoca de cacahuete en los extractos obtenidos a partir de los tres protocolos evaluados. Estos resultados demuestran, nuevamente, que el empleo de MBs en la edificación de inmunosensores permite el aislamiento eficiente de las proteínas de interés por simple atracción magnética directamente de extractos

alimentarios complejos, sin necesidad de realizar etapas previas de extracción de las proteínas de interés o pretratamientos laboriosos de muestra.

4.2.1.4. Detección total de las principales proteínas alergénicas del cacahuete en matrices alimentarias

A partir de los resultados obtenidos hasta el momento en la determinación individual y simultánea de Ara h 1 y Ara h 2, se valoró la posibilidad de desarrollar una estrategia para su determinación total, realizando la detección electroquímica sobre SPCEs.

Para ello, se evaluó la implementación de una variante basada en la combinación de lotes individuales de los inmunocaptos (anti-Ara h 1-MBs y anti-Ara h 2(C)-MBs) y la incubación del conjunto, secuencialmente, con la muestra, y con mezclas de los anticuerpos de detección y de los reactivos empleados para realizar los marcajes enzimáticos de los inmunocomplejos tipo sándwich obtenidos con ambas proteínas diana. Tras su preparación, se captura magnéticamente el conjunto de MBs sobre SPCEs para realizar la transducción amperométrica (Fig. 4.33, a). En primer lugar, se evaluó la viabilidad de esta variante para la determinación del contenido total de Ara h 1 y Ara h 2.

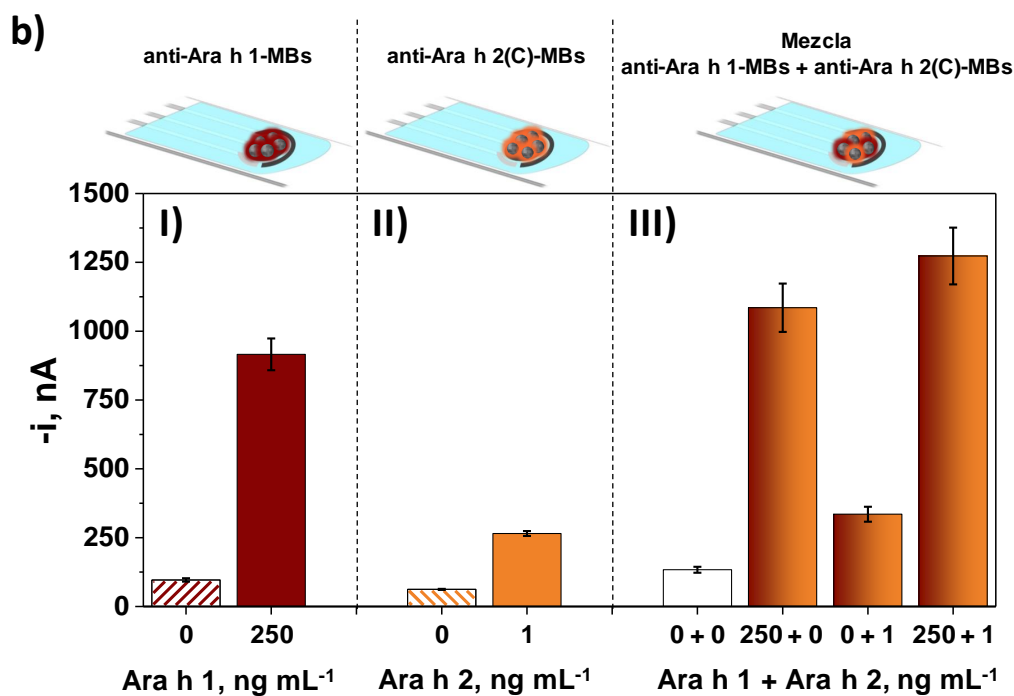
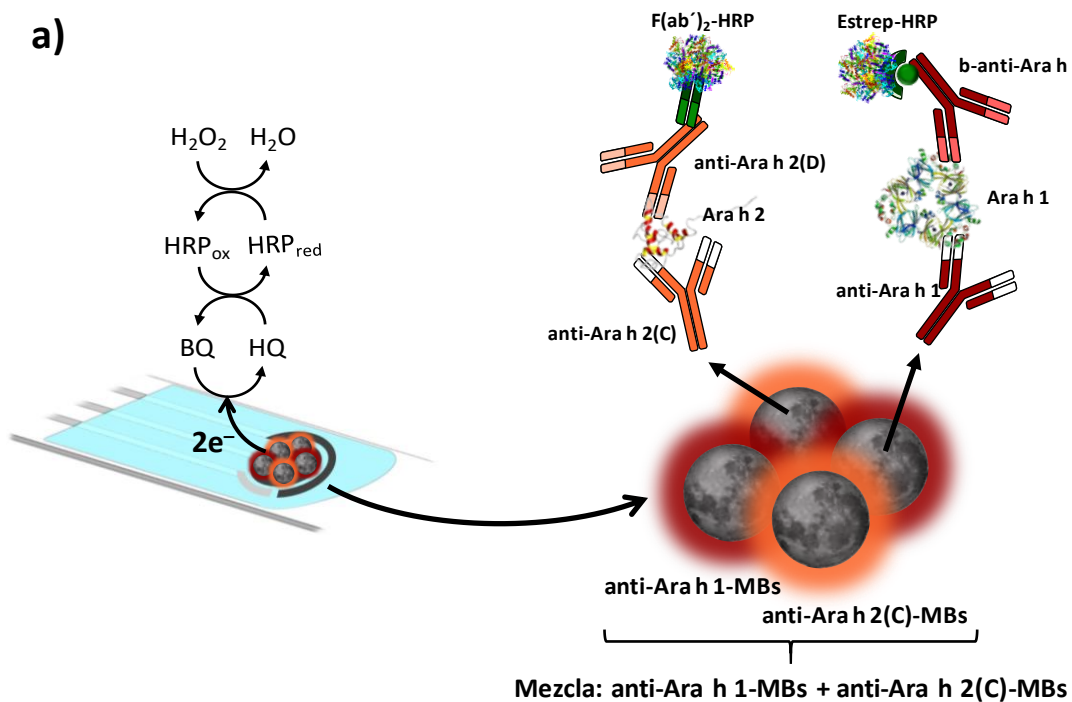


Fig. 4.33. a) Diagrama esquemático de la metodología desarrollada para la detección total de Ara h 1 y Ara h 2 en un SPCE. b) Respuestas amperométricas obtenidas con las plataformas inmunosensoras para la determinación individual de Ara h 1 (I), Ara h 2 (II) y para la mezcla del contenido total de Ara h 1 y Ara h 2 (III) en el análisis de estándares individuales de cada proteína diana o mezclas de estos. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados mostrados (Fig. 4.33) confirman la ausencia de reactividad cruzada entre los bioreactivos empleados en la formación de los inmunocomplejos para Ara h 1 y Ara h 2 también empleando esta variante. Además, es interesante destacar que las respuestas amperométricas obtenidas empleando la variante de la metodología para la determinación del contenido total en el análisis de la mezcla que contiene 250.0 ng mL^{-1} de estándar de Ara h 1 y 1.0 ng mL^{-1} de estándar de Ara h 2 (Fig. 4.33, III), de magnitud $(1273 \pm 256) \text{ nA}$, es concordante con la suma de las respuestas amperométricas obtenidas para la determinación individual de ambas proteínas $((916 \pm 143) \text{ nA}$ (Fig. 4.33, I) y $(265 \pm 22) \text{ nA}$ (Fig. 4.33, II)).

Con objeto de ampliar el intervalo lineal de determinación de cacahuete, y por tanto, el espectro de muestras susceptibles de ser analizadas por la nueva variante desarrollada, se evaluó su aplicación para el análisis de muestras de harina de trigo sin suplementar o suplementadas con cantidades crecientes de harina de cacahuete. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.34.

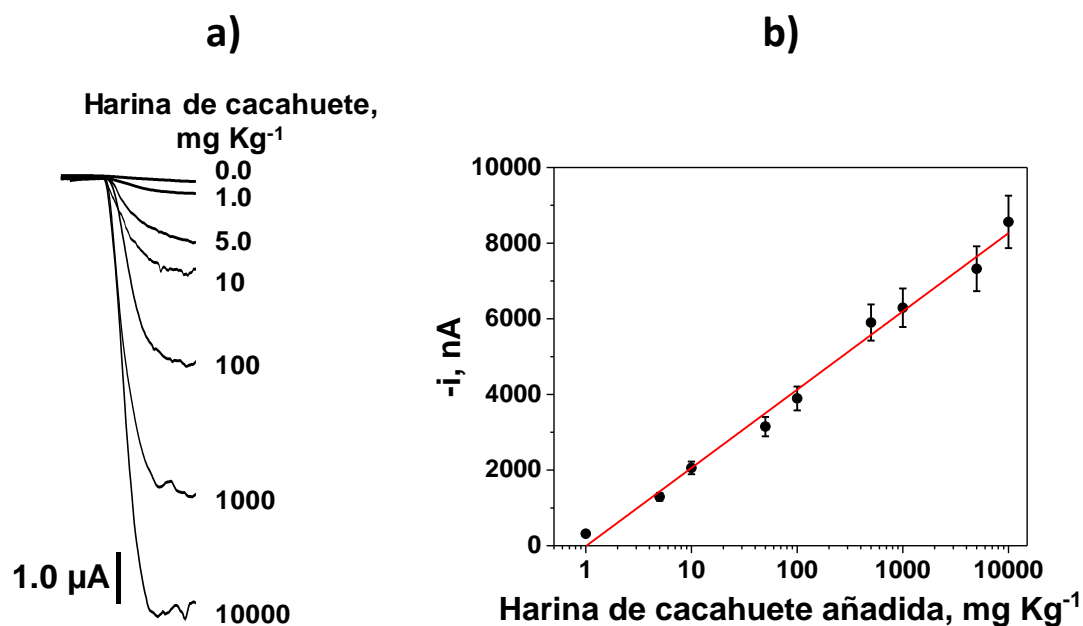


Fig. 4.34: Respuestas amperométricas (a) y dependencia lineal (b) obtenidos en el análisis de extractos preparados a partir de muestras de harina de trigo sin suplementar o suplementadas con cantidades crecientes de harina de cacahuete ($1.0\text{--}10000 \text{ mg Kg}^{-1}$). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos (Fig. 4.34, b) demuestran una dependencia lineal de las respuestas amperométricas con el logaritmo de la cantidad de harina de cacahuete comprendido entre $(1.0-10000) \text{ mg Kg}^{-1}$ ($r = 0.995$), con una pendiente de $(2070 \pm 60) \text{ nA}$ y una ordenada en el origen de $(-13 \pm 147) \text{ nA}$.

Esta inesperada dependencia lineal puede justificarse con los resultados obtenidos en la determinación de harina de cacahuete con la plataforma dual desarrollada, donde se obtuvieron sensibilidades “comparables”, teniendo en cuenta el análisis de cacahuete en intervalos de concentración 100 veces superiores: $(100-10000) \text{ mg Kg}^{-1}$ en la detección de Ara h 1 (Fig. 4.31, b) vs. $(1.0-100) \text{ mg Kg}^{-1}$, en la detección de Ara h 2 (Fig. 4.31, a) (Tabla 4.15), obteniéndose valores de pendientes de $(20.9 \pm 0.5)/100$ y $(21 \pm 1) \text{ nA Kg mg}^{-1}$, respectivamente. Para su justificación se ha realizado una aproximación teórica de las respuestas obtenidas teniendo en cuenta las sensibilidades individuales y la contribución de ambas proteínas (Fig. 4.31), observando una dependencia lineal de las respuestas amperométricas con el logaritmo de la cantidad de harina de cacahuete, con una sensibilidad de $(1082 \pm 200) \text{ nA}$. El hecho de que la sensibilidad obtenida teóricamente sea dos veces inferior a la obtenida experimentalmente $((2070 \pm 60) \text{ nA})$ se justifica perfectamente teniendo en cuenta que los electrodos individuales tienen una superficie activa dos veces superior a la de los duales ($12.6 \text{ vs. } 6.3 \text{ mm}^2$).

Esta aproximación teórica confirma los resultados obtenidos en el análisis de muestras contaminadas con harina de cacahuete empleando la nueva variante desarrollada (mezcla de inmunocaptadores para Ara h 1 y Ara h 2) (Fig. 4.34).

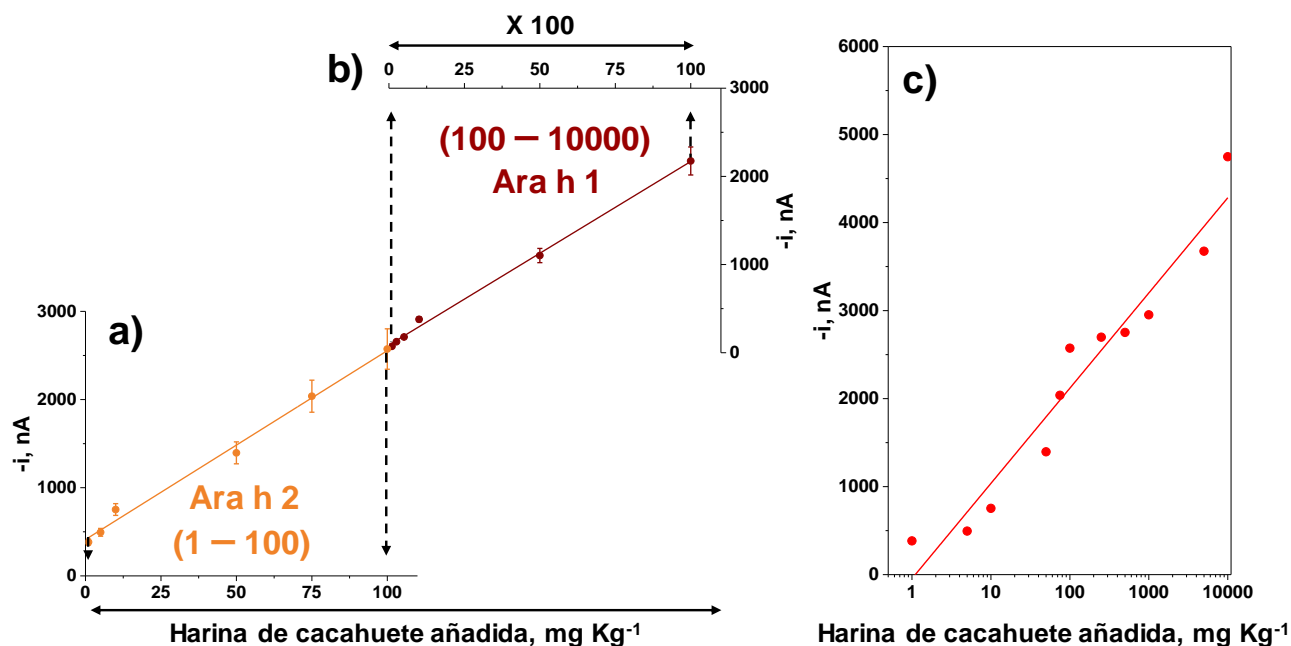


Fig. 4.35. Regresiones lineales obtenidas entre las respuestas amperométricas y la cantidad de harina de cacahuete comprendidas entre (1.0–100) mg Kg⁻¹ para Ara h 2 (a) y (100–10000) mg Kg⁻¹ para Ara h 1 (b) empleando la plataforma dual desarrollada. Las barras de error se estimaron como tres veces la desviación estándar ($n = 3$). c) Regresión lineal de los valores calculados teóricamente como la suma de las contribuciones de Ara h 1 y Ara h 2 con el logaritmo de la cantidad de cacahuete presente.

La sinergia del empleo de los inmunocaptadores desarrollados para Ara h 1 y Ara h 2, de forma conjunta, para la detección del contenido total de las principales proteínas alergénicas del cacahuete, y su capacidad para la detección de cacahuete en diferentes intervalos de concentración (Fig. 4.34), pone de manifiesto el potencial de esta variante como herramienta sencilla, atractiva, eficaz y rápida para la determinación de la presencia de cacahuete a niveles de traza y en más de 4 órdenes de magnitud, empleando solo una medida electroquímica sobre SPCE.

Los resultados recogidos en los apartados 4.1.2 y 4.2.1 de esta Tesis Doctoral demuestran que el empleo de inmunocaptadores magnéticos permite el desarrollo de inmunosensores de elevada flexibilidad para la detección individual o multiplexada de Ara h 1 y Ara h 2, o su combinación, para la determinación de cacahuete en un amplio espectro de concentraciones.

En este punto, es importante mencionar la dificultad de controlar el proceso de inmovilización de diferentes anticuerpos de captura sobre una misma superficie transductora para el desarrollo de plataformas inmunosensoras electroquímicas u ópticas

de multidetección. En este sentido, el empleo de materiales con propiedades magnéticas como soportes sólidos, que pueden modificarse de forma independiente e integrarse de forma sencilla en plataformas de multiplexado de distintos marcadores de interés [Tang, 2011], [Conzuelo, 2014-a], ofrece una alternativa muy interesante que no requiere ni re-optimizar los protocolos de fabricación, ni poner a punto protocolos complejos para realizar inmovilizaciones dirigidas para controlar la carga de cada uno de los anticuerpos a emplear. Resulta destacable, además, la posibilidad de modular las propiedades analíticas de las plataformas finales, dependiendo de la aplicación requerida, simplemente variando la cantidad de inmunocaptosres magnéticos empleados y el tipo/área de los electrodos sobre los que se realiza la transducción electroquímica.

4.2.2. Plataforma inmunosensora para la detección de adulteraciones en leche a través de la determinación individual o simultánea de las IgGs bovinas, ovinas y caprinas

En este apartado se discuten los resultados más relevantes del artículo: Ruiz-Valdepeñas Montiel et al. *Disposable amperometric immunosensor for the detection of adulteration in milk through single or multiplexed determination of bovine, ovine or caprine immunoglobulins G*. *Anal. Chem.* 91 (2019) 11266–11274, aportado como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

Además de la detección de alérgenos alimentarios, en el campo de la seguridad alimentaria existen otros problemas que requieren atención, como la detección de la adulteración de productos lácteos que, aparte de afectar a su calidad, puede conllevar riesgos para la salud, problemas económicos y pérdida de confianza por parte de los consumidores [Borková, 2005].

La detección de adulteraciones de productos lácteos, con leche o calostro de diferente origen animal, adquiere cada día mayor importancia en la protección de la identidad única de productos lácteos como los quesos, además de existir razones religiosas, éticas o culturales e incluso problemas de salud, como intolerancias o alergias a la leche de determinadas especies. Sin embargo, la similitud en composición de la leche entre especies dificulta, en gran medida, la identificación de su origen animal

[Hurley, 2004], [Harley, 2016], [Borková, 2005], [Abdelfatah, 2015], [Galán-Malo, 2018]. Por ello, y teniendo en cuenta la elevada selectividad obtenida en el empleo de inmunoensayos tipo sándwich, se han desarrollado plataformas inmunosensoras para la identificación sensible y selectiva de este tipo de adulteraciones mediante la detección individual o múltiple de las inmunoglobulinas G (IgGs) bovinas, ovinas y caprinas presentes en la leche. Los fundamentos de las plataformas desarrolladas se muestran esquemáticamente en la Fig. 4.36.

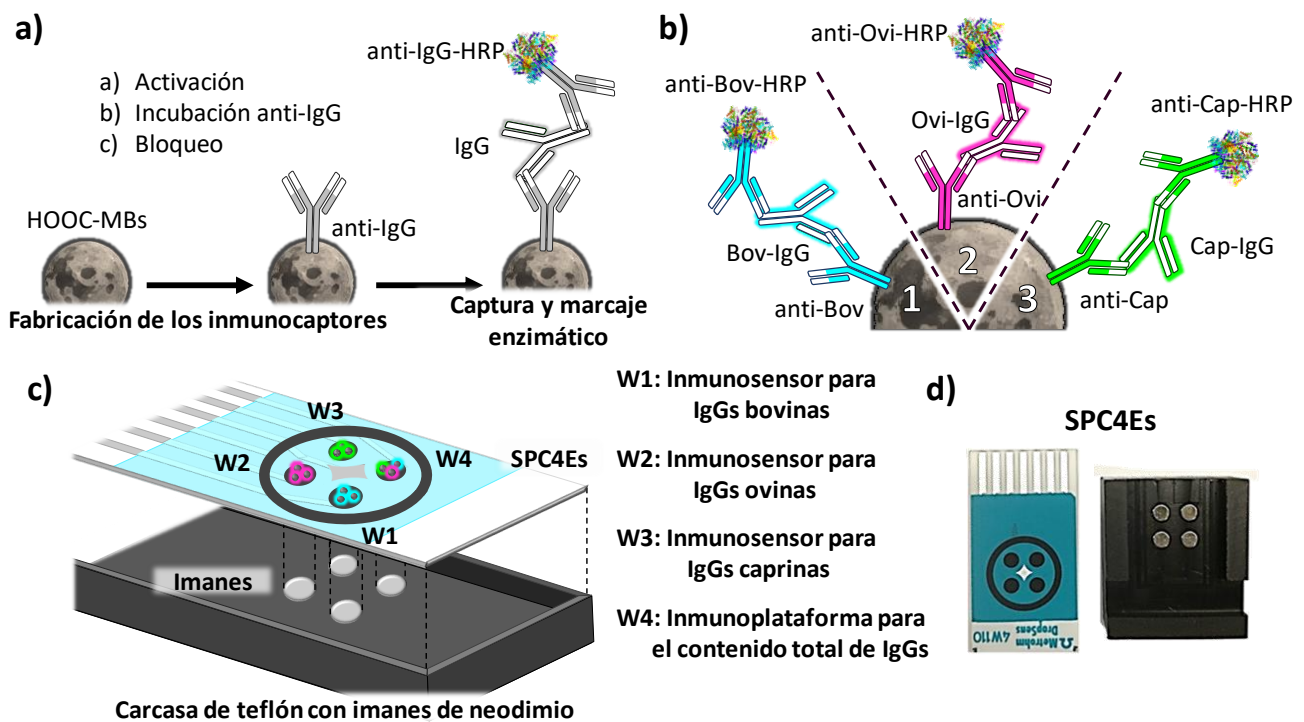


Fig. 4.36: a) Diagramas esquemáticos de los protocolos de fabricación de los inmunocaptadores y su aplicación al análisis de IgGs bovinas (Bov), ovinas (Ovi) o caprinas (Cap), b) inmunocomplejos formados sobre la superficie de las MBs empleados para la determinación individual o simultánea de IgGs, c) conjunto carcasa de teflón-SPC4Es y disposición de las MBs modificadas con los inmunocomplejos tipo sándwich en cada electrodo de trabajo e d) imágenes reales del SPC4Es y de la carcasa de teflón dispuesta con 4 imanes.

En la Fig. 4.36 se muestra, de manera esquemática, el protocolo de fabricación de los inmunosensores desarrollados para la determinación de IgGs bovinas (Bov), ovinas (Ovi), caprinas (Cap) y totales (Fig. 4.36, a y b). Brevemente, se utilizaron anticuerpos específicos para cada una de las IgGs diana, cedidos por la empresa Zeulab S.L., que se

emplean sin modificar como anticuerpos de captura (anti-Bov, anti-Ovi o anti-Cap) o conjugados con HRP como anticuerpos de detección (anti-Bov-HRP, anti-Ovi-HRP o anti-Cap-HRP). En la fabricación de los inmunocaptadores, cada anticuerpo de captura se inmovilizó covalentemente en la superficie de las HOOC-MBs, activadas previamente con una disolución de EDC/Sulfo-NHS, bloqueándose posteriormente los grupos carboxílicos residuales activados con etanolamina. Los inmunocaptadores magnéticos resultantes (anti-Bov-MBs, anti-Ovi-MBs o anti-Cap-MBs) se incubaron de forma individual con los estándares de IgGs (Bov-IgG, Ovi-IgG o Cap-IgG) o las muestras a analizar suplementadas con el correspondiente anticuerpo de detección (anti-Bov-HRP, anti-Ovi-HRP o anti-Cap-HRP) para el reconocimiento selectivo de cada IgG y su marcaje enzimático. Las MBs con los inmunocomplejos tipo sándwich formados sobre su superficie, se capturaron magnéticamente sobre la superficie de los electrodos de trabajo de SPCEs o SPC4Es (Fig. 4.36, c y d) para la determinación individual o simultánea de las IgGs de interés. Los procesos de inmunoreconocimiento se monitorizaron mediante la variación de la corriente catódica obtenida por amperometría en disoluciones agitadas en presencia del sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HQ}$.

4.2.2.1. Fiabilidad de los inmunoensayos y optimización de variables experimentales

En primer lugar, se evaluó la viabilidad de estos formatos de inmunoensayo tipo sándwich sobre μ -soportes magnéticos para la determinación sensible y selectiva de cada uno de estos tres tipos de IgGs. Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de estándares de 250 ng mL^{-1} de cada IgG específica empleando MBs sin modificar o modificadas, de forma independiente, con cada anticuerpo de captura (anti-Bov-MBs, anti-Ovi-MBs o anti-Cap-MBs).

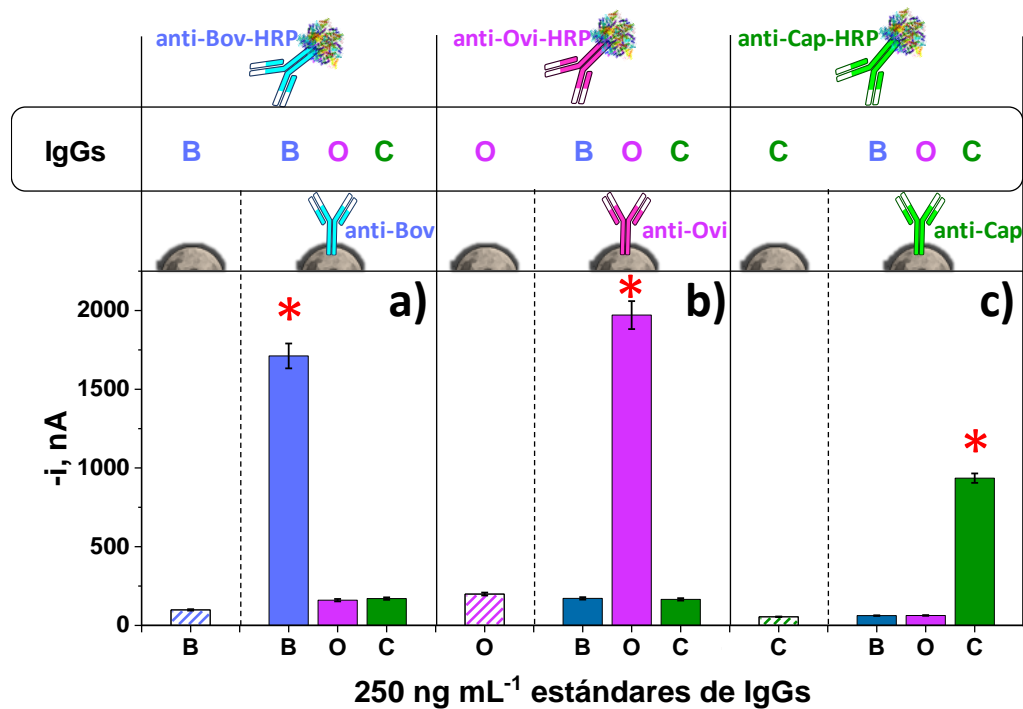


Fig. 4.37: Respuestas amperométricas obtenidas con los inmunosensores desarrollados para la determinación de IgGs bovinas a), ovinas b) o caprinas c) en el análisis de estándares de 250 ng mL⁻¹ de IgGs bovinas (B), ovinas (O) y caprinas (C), empleando MBs sin modificar (barras rayadas) o modificadas con el anti-Bov (a), anti-Ovi (b) o anti-Cap (c). Las barras marcadas con * confirman la formación específica de cada inmunocomplejo tipo sándwich. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos (Fig. 4.37) demuestran la obtención de respuestas amperométricas significativas, únicamente en presencia de la IgG diana correspondiente y empleando las MBs modificadas con el anticuerpo de captura específico para ella. Estos resultados confirman la detección selectiva de las IgGs específicas de la leche de vaca, oveja o cabra, respectivamente, y la posibilidad de desarrollar inmunosensores tipo sándwich empleando el mismo anticuerpo para la captura y la detección de cada IgG diana.

Las variables experimentales involucradas en la fabricación de los inmunosensores se optimizaron individualmente para la determinación de cada una de las IgGs, tomándose como criterios para la selección tanto los valores más altos de la relación (S (250 ng mL⁻¹ de estándares de cada IgG diana)/B), como la posibilidad de unificar de forma sencilla los protocolos a emplear, fundamentalmente en número de etapas y tiempos requeridos de incubación, para su multiplexado.

A continuación, se muestran (Fig. 4.38) y comentan brevemente las optimizaciones obtenidas en la evaluación del tiempo de incubación de cada anticuerpo de captura sobre las MBs, del número de etapas y del tiempo de análisis (tiempo de incubación con la mezcla del estándar de cada IgG diana suplementada con el anticuerpo de detección correspondiente).

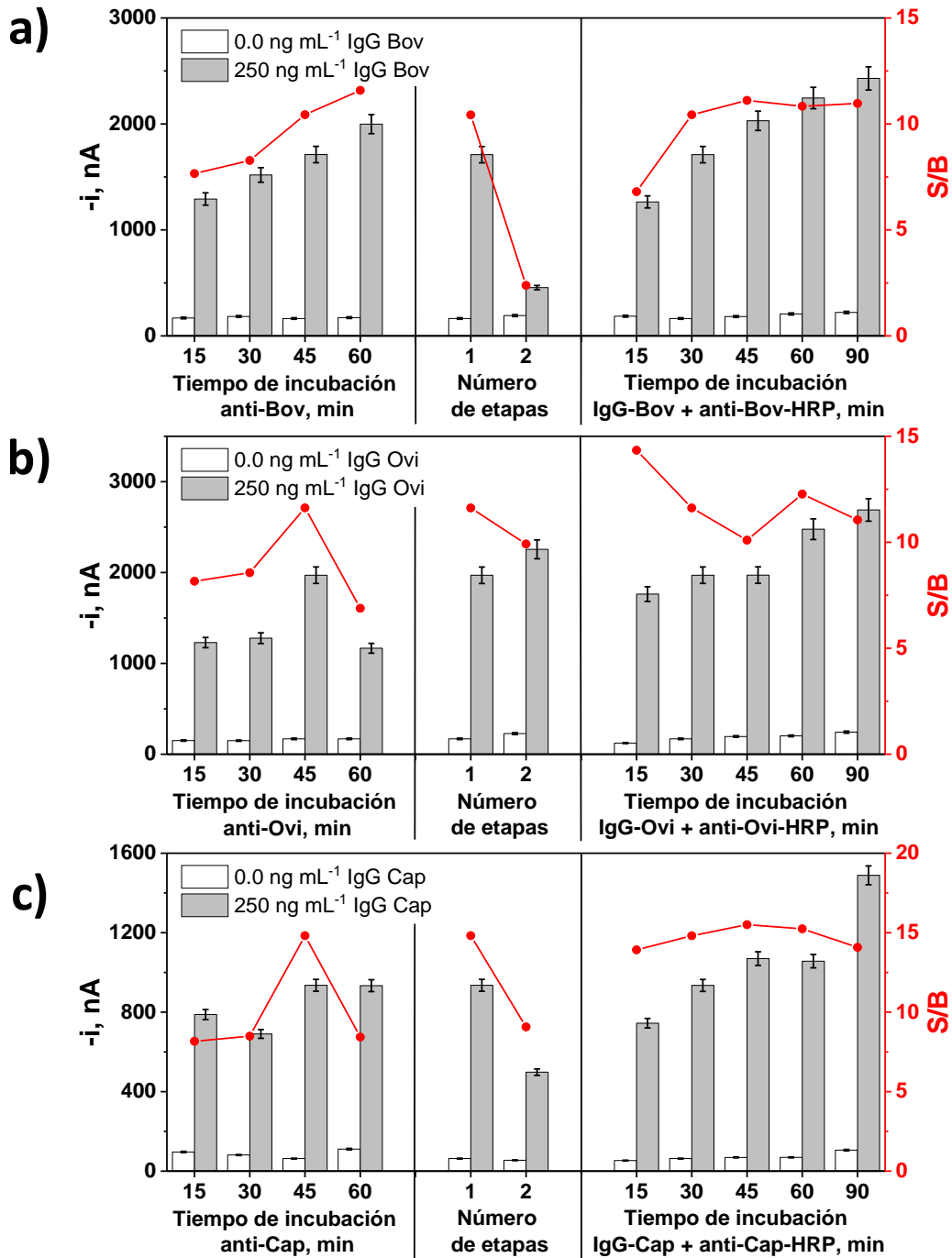


Fig. 4.38: Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y presencia (S, barras grises) de estándares de 250 ng mL⁻¹ de IgGs bovinas a), ovinas b) o caprinas c) y la relación de señales resultante (S/B, línea roja) en la evaluación del tiempo de incubación de cada anticuerpo de captura, el número de etapas y el tiempo de análisis (tiempo de incubación con la mezcla del estándar de cada IgG diana suplementada con el anticuerpo de detección correspondiente) empleadas para la formación de los inmunocomplejos tipo sándwich sobre MBs para la determinación de IgGs bovinas a), ovinas b) o caprinas c). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados mostrados en la Fig. 4.38 demuestran la obtención de mejores relaciones S/B para los tres tipos de IgGs cuando se lleva a cabo, de forma simultánea, su captura por parte de los inmunocaptadores magnéticos y su reconocimiento y marcaje enzimático con el anticuerpo de detección correspondiente conjugado a HRP. Estos resultados simplifican la metodología, que puede realizarse en una única etapa, y reducen el tiempo de ensayo.

Con el objetivo de simplificar y unificar los protocolos de determinación individual para la determinación multiplexada de las IgGs diana, se seleccionaron tiempos de incubación de 45 y 30 min para la modificación de las MBs con cada anticuerpo de captura y la formación del inmunocomplejo tipo sándwich para cada IgG sobre los inmunocaptadores, respectivamente, sin comprometer significativamente la sensibilidad de la determinación final.

Todas las variables estudiadas, así como los valores obtenidos como óptimos y los seleccionados como compromiso para facilitar su empleo en plataformas de multidetección se recogen en la Tabla 4.16. Otras variables involucradas en el proceso de detección amperométrica, como las concentraciones de H_2O_2 e HQ y el potencial de detección a aplicar (-0.20 V vs. electrodo de referencia de Ag/AgCl), se optimizaron previamente en el Grupo de Investigación [\[Conzuelo, 2012-a\]](#), [\[Eguílaz, 2010\]](#), [\[Gamella, 2012\]](#).

Tabla 4.16. Variables experimentales optimizadas, intervalos evaluados y valores seleccionados como óptimos o como compromiso para facilitar su unificación en el desarrollo de las plataformas inmunosensoras para la determinación amperométrica individual de IgGs bovinas, ovinas o caprinas.

Variable experimental	Intervalo evaluado	Valores óptimos			Seleccionados como compromiso
		IgGs bovinas	IgGs ovinas	IgGs caprinas	
V_{HOOC-MBs}, μL	—	3.0^a	3.0^a	3.0^a	Valores óptimos
[anti-(Bov, Ovi o Cap)], $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.0 – 100.0	10.0	25.0	50.0	Valores óptimos
Tiempo de incubación del anti-(Bov, Ovi o Cap), min	15 – 60	60	45	45	45
Dilución anti-(Bov, Ovi o Cap)-HRP	1/5000 – 1/250	1/1000	1/500	1/1000	Valores óptimos
Número de etapas	1 – 2	1	1	1	1
Tiempo de análisis, min	15 – 90	30	15	30	30

^aVariables optimizadas en trabajos previos del Grupo de Investigación [Esteban-Fernández de Ávila, 2013].

4.2.2.2. Características analíticas y operacionales

Trabajando en las condiciones experimentales resumidas en la Tabla 4.16, se caracterizó el comportamiento analítico de las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación individual de estándares de diferente concentración de IgGs bovinas, ovinas o caprinas (preparados en solución bloqueante de caseína), obteniéndose las rectas de calibrado que se muestran en la Fig. 4.39.

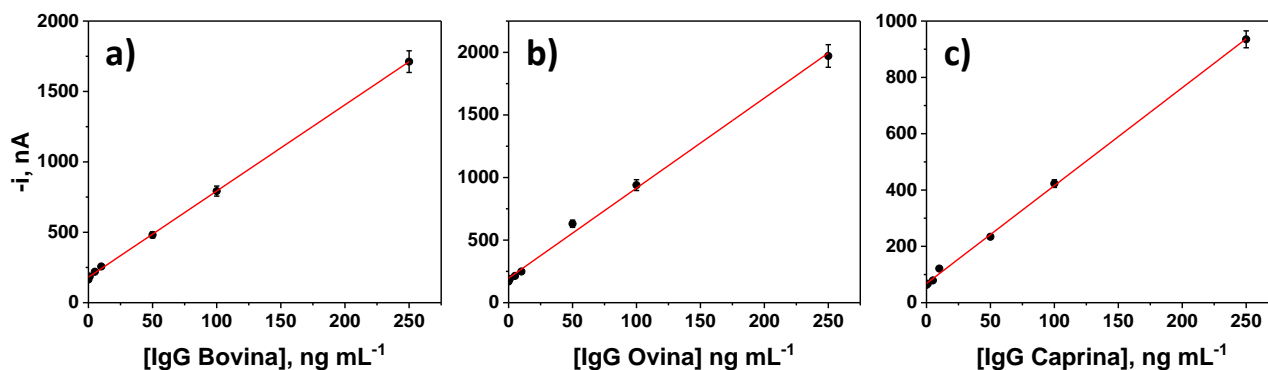


Fig. 4.39: Rectas de calibrado obtenidas en la determinación amperométrica individual de estándares de IgGs bovinas a), ovinas b) o caprinas c) con las tres plataformas inmunosensoras desarrolladas. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Como se observa en la Fig. 4.39, existe una dependencia lineal de las respuestas amperométricas obtenidas con la concentración de estándares de IgGs de cada especie evaluada en los intervalos de concentración comprendidos entre (2.6–250.0) ng mL^{-1} ($r = 0.999$), (2.7–250.0) ng mL^{-1} ($r = 0.998$) y (2.2–250.0) ng mL^{-1} ($r = 0.999$), con las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación de IgGs bovinas a), ovinas b) o caprinas c), respectivamente, obteniendo LDs de 0.74, 0.82 o 0.66 ng mL^{-1} , respectivamente, empleando el criterio $3 s_b/m$, siendo “ s_b ” la desviación estándar de 10 señales amperométricas obtenidas en ausencia de la IgG diana, y “ m ” la pendiente del calibrado obtenido para estándares de la IgG correspondiente.

Las características operacionales de las tres plataformas inmunosensoras desarrolladas se examinaron de forma conjunta. En primer lugar, se evaluó la reproducibilidad de las respuestas amperométricas proporcionadas por 8 inmunosensores diferentes preparados de la misma manera, para estándares de 100 ng mL^{-1} de IgGs bovinas, ovinas o caprinas, empleando cada plataforma inmunosensora desarrollada, obteniéndose valores de RSD de 4.5, 4.6 y 3.2 %, respectivamente. Estos resultados demuestran la robustez y fiabilidad de los procesos de fabricación, análisis y transducción electroquímica empleados.

También se evaluó la estabilidad con el tiempo de los inmunocaptadores magnéticos (anti-Bov-MBs, anti-Ovi-MBs y anti-Cap-MBs) almacenados a 4 °C en una disolución de PBS (pH 7.5) filtrada. Para ello, se controlaron los valores de la relación resultante (S/B) obtenida a partir de las respuestas amperométricas proporcionadas en ausencia (B) o presencia (S) de 100 ng mL^{-1} de estándares de cada IgG diana cada día de control. Los

resultados obtenidos (Fig. 4.40) demuestran la obtención de respuestas reproducibles y sin pérdida significativa de sensibilidad durante al menos los 67 días posteriores a su preparación (no se ensayaron tiempos superiores). Estos datos confirman la excelente estabilidad de almacenamiento de los inmunocaptadores magnéticos, que pueden prepararse y almacenarse durante más de dos meses, permitiendo llevar a cabo el análisis de las muestras de interés en sólo 30 min.

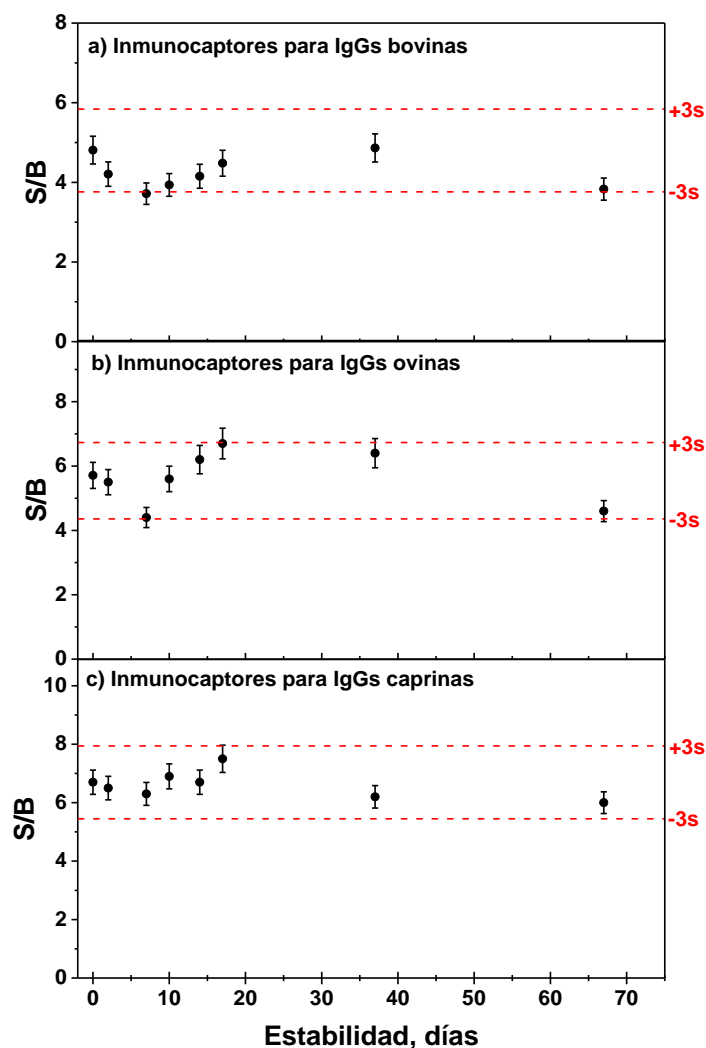


Fig. 4.40: Estabilidad de almacenamiento de los inmunocaptadores preparados para la determinación de las IgGs bovinas a), ovinas b) o caprinas c) almacenados tras su preparación en PBS filtrado a 4 °C.

Relación (S/B) resultante entre las respuestas amperométricas obtenidas con las inmunoplateformas preparadas a partir de ellos en ausencia (B) y presencia de 100 ng mL⁻¹ de estándares de cada IgG diana (S). Gráfico de control construido tomando como valor medio la relación S/B obtenida para 10 inmunosensores preparados el primer día de estudio (día de preparación de los inmunocaptadores) y como límites superior e inferior $+3s$ y $-3s$, respectivamente, de dicho valor medio, siendo “s” la desviación estándar que resulta para los 10 valores de S/B obtenidos. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar (n=3).

Todas las características analíticas y operacionales obtenidas para la determinación amperométrica individual de estándares de cada IgGs específica con las inmunoplateformas desarrolladas, se recogen en la Tabla 4.17.

Tabla 4.17. Características analíticas y operacionales obtenidas con las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación amperométrica individual de estándares de IgGs bovinas, ovinas y caprinas.

Parámetros	Inmunosensor para IgGs bovinas	Inmunosensor para IgGs ovinas	Inmunosensor para IgGs caprinas
r	0.999	0.998	0.999
Pendiente, nA mL ng ⁻¹	(6.1 ± 0.1)	(7.2 ± 0.5)	(3.5 ± 0.1)
Ordenada en el origen, nA	(181 ± 13)	(196 ± 48)	(68 ± 12)
Intervalo lineal, ng mL ⁻¹	2.6–250	2.7–250	2.2–250
LD, ng mL ⁻¹	0.74 (18.5 pg)	0.82 (20.5 pg)	0.66 (16.5 pg)
LC, ng mL ⁻¹	2.6 (65.0 pg)	2.7 (67.5 pg)	2.2 (55.0 pg)
RSD _(n=8, 100 ng mL⁻¹) , %	4.5	4.6	3.2
Estabilidad, días	≥ 67		

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que se han desarrollado, por primera vez, tres plataformas inmunosensoras electroquímicas para la determinación selectiva de las IgGs específicas de vaca, oveja o cabra, que requieren un tiempo de análisis significativamente más corto (30 vs. 60–120 min) y ofrecen mejores LDs que los declarados para la mayoría de los kits ELISAs disponibles y mejorando entre 15–94 veces los LDs con respecto a los kits ELISAs comerciales. Es importante destacar en este punto, la mejora significativa en los LDs (0.74, 0.82 y 0.66 vs. 70.0, 14.0 y 10.0 ng mL⁻¹ para IgGs bovinas, ovinas y caprinas, respectivamente) y en un tiempo de ensayo tres veces inferior en comparación con los kits comercializados por la empresa Zeulab S.L., que emplean los mismos inmunoreactivos.

Resulta interesante mencionar también, que la obtención de características analíticas y operacionales similares en la determinación de las IgGs presentes en leche de vaca, oveja o cabra y empleando protocolos de fabricación y análisis análogos, resulta de gran interés para su aplicación práctica en el desarrollo de plataformas

inmunosensoras para multiplexado, teniendo en cuenta que los niveles de IgGs en este tipo de muestras son similares para todos los rumiantes. Además, la mejora de sensibilidad alcanzada, en comparación con la metodología ELISA, permitiría aplicar estas inmunoplateformas a la detección de procesos de adulteración en quesos, donde el menor contenido de IgGs por los procesos de proteólisis y desnaturalización que ocurren durante la fabricación del queso y el posible efecto de su matriz [Harley, 2016] hace necesario el empleo de metodologías con mayor sensibilidad.

4.2.2.3. Evaluación de la selectividad

Teniendo en cuenta la similitud en la composición de muestras de leche de distinto origen animal y el objetivo de desarrollar una plataforma inmunosensora para la identificación simultánea de adulteraciones con leche de vaca, oveja y cabra, resulta esencial asegurar la selectividad de las plataformas inmunosensoras desarrolladas, tanto en presencia de otras IgGs no diana, como en muestras de leche de otros rumiantes.

Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 y 100 ng mL⁻¹ de cada IgG diana preparados en ausencia o presencia de 100 ng mL⁻¹ de otras IgGs no diana en disoluciones tampón (Figs. 4.41, I), o en el análisis de muestras de leche cruda, pasteurizada o UHT de vaca, oveja, cabra o búfala (Figs. 4.41, II).

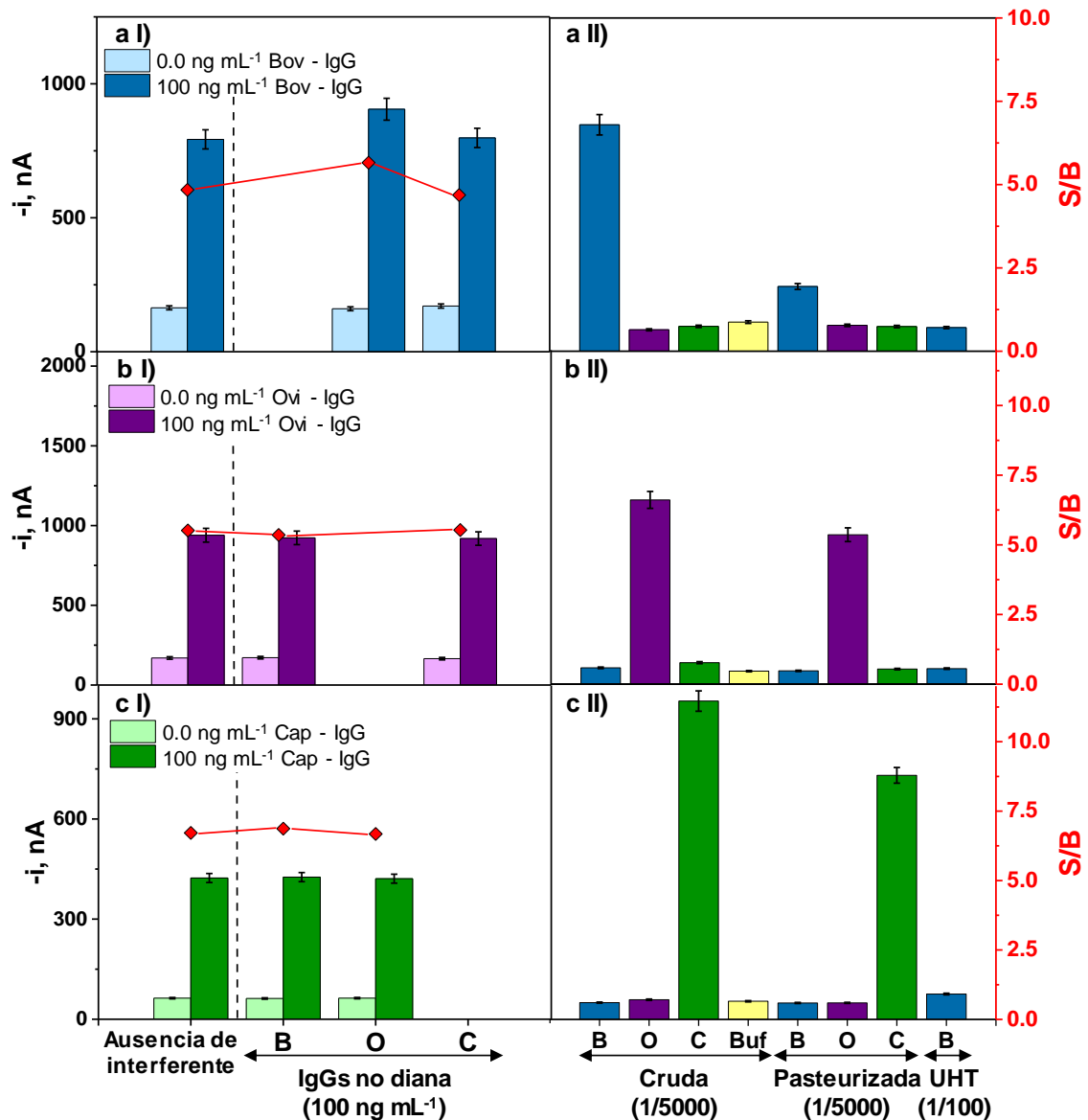


Fig. 4.41: Respuestas amperométricas obtenidas con las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación de IgGs bovinas a), ovinas b) y caprinas c) en el análisis de estándares de 0.0 y 100.0 ng mL⁻¹ de cada IgG diana preparados en ausencia o en presencia de 100.0 ng mL⁻¹ de las demás IgGs no diana en disoluciones tampón I) o en el análisis de muestras de leche cruda, pasteurizada o UHT de vaca (B, barras azules), oveja (O, barras moradas), cabra (C, barras verdes) o de búfala (Buf, barras amarillas) II). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos demuestran la ausencia de diferencias significativas entre las relaciones S/B proporcionadas en ausencia o presencia de otras IgGs no diana (Fig. 4.41, I), confirmando la ausencia de reactividad cruzada entre IgGs de diferente origen animal y la excelente selectividad de los anticuerpos empleados en el desarrollo de las plataformas inmunosensoras sólo hacia su IgG diana. Estos resultados se

confirman también por la excelente selectividad encontrada en el análisis de distintas muestras de leche (Fig. 4.41, II). Resulta muy interesante destacar la posibilidad de discriminar claramente entre muestras de leche de especies de gran similitud, como la oveja y la cabra (Fig. 4.41, b II) y c II)), e incluso en mayor medida entre la vaca y el búfalo (Fig. 4.41, a II), en las que la elevada homología entre sus principales proteínas lácteas dificulta tremendamente su discriminación [Galán-Malo, 2018], [Hurley, 2004].

4.2.2.4. Análisis de muestras de leche y detección de adulteraciones

Las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación de IgGs bovinas, ovinas y caprinas se aplicaron al análisis de muestras de leche o calostros de vaca, oveja o cabra, con diferentes procesados (leche cruda, pasteurizada o UHT), adquiridas en supermercados o granjas locales. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 4.18.

En primer lugar, se evaluó la posible existencia de efecto matriz en cada una de las muestras analizadas. Los resultados obtenidos demostraron la ausencia de diferencias significativas entre las pendientes de las curvas de calibrado construidas en ausencia ((6.1 ± 0.1) , (7.2 ± 0.5) y (3.5 ± 0.1) nA mL ng⁻¹) o presencia de muestras de leche de vaca, oveja o cabra (diluidas 100 veces en solución bloqueante de caseína) y suplementadas con concentraciones creciente de cada IgG estándar ((5.8 ± 0.7) , (7.8 ± 0.7) y (3.7 ± 0.3) nA mL ng⁻¹) en la determinación de IgGs bovinas, ovinas o caprinas, respectivamente. Teniendo en cuenta estos resultados, la determinación del contenido endógeno de cada IgG de interés se realizó por simple interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas en los calibrados construidos para estándares de cada IgG diana, mostrados en la Fig 4.39.

Tabla 4.18: Contenidos endógenos de IgGs (en mg mL⁻¹) obtenidos empleando las plataformas inmunosensoras desarrolladas en el análisis de muestras de leche o calostro de vaca, oveja o cabra, sometidas a diferentes procesos (leche cruda, pasteurizada o UHT).

Animal	Tipo de leche (dilución)	IgGs bovinas	IgGs ovinas	IgGs caprinas	Valores reportados en bibliografía
Vaca	Cruda (1/5000)	(0.52 ± 0.05)	ND	ND	(0.03–0.71) [Li-Chan, 1995] 0.59 [Park, 2011]
	Pasteurizada (1/5000)	(0.050 ± 0.001)	ND	ND	(0.04–0.24) [Chan, 1995]
	UHT (1/100)	ND	ND	ND	ND [Li-Chan, 1995], [Korhonen, 2000] 0.003 o ppm [Kummer, 1992]
Oveja	Calostro (1/100000)	ND	(6.2 ± 0.3)	ND	(9.25) [Navarro, 2018] (≥0.47) [Galán-Malo, 2014]
	Cruda (1/5000)	ND	(0.64 ± 0.07)	ND	(0.25) [Navarro, 2018] (0.2) [Galán-Malo, 2014]
	Pasteurizada (1/5000)	ND	(0.53 ± 0.03)	ND	(↓ 17.5 % IgG en comparación con leche cruda) *[Korhonen, 2000]
	UHT (1/100)	ND	ND	ND	–
Cabra	Calostro (1/100000)	ND	ND	(26 ± 4)	(32.98 ± 14.39) [Argüello, 2003]
	Cruda (1/5000)	ND	ND	(1.1 ± 0.2)	(≤1–2) [Levieux, 2002]
	Pasteurizada (1/5000)	ND	ND	(0.86 ± 0.04)	(↓ 24.5 % IgG en comparación con leche cruda) *[Korhonen, 2000]
	UHT (1/100)	ND	ND	ND	–

ND: no detectable. *[Korhonen, 2000]: Pérdida de un (10±30) % de la actividad de las IgGs realizando una pasteurización flash (HTST, High Temperature/Short Time, 72 °C/15 s).

Como demuestran los resultados comparativos de la Tabla 4.18, los contenidos de IgGs obtenidos en las muestras de leche analizadas están de acuerdo con los valores descritos en la literatura. Los resultados confirman, además, la disminución del contenido de IgGs en función de la agresividad del tratamiento térmico empleado. Como puede observarse, se retiene un 25–75 % de los niveles de IgGs en muestras de leche pasteurizada en comparación con los niveles encontrados en leche cruda, y no se encuentra actividad en las muestras de leche UHT debido a la desnaturalización de los epítomos inmunogénicos de las IgGs [Hurley, 2011], [Korhonen, 2000]. Debido a la falta de disponibilidad comercial de leche de oveja y cabra pasteurizada, estas se

prepararon a partir de las correspondientes leches crudas empleando el protocolo de pasteurización HTST (72 °C, 15 s), descrito por Korhonen y col., obteniendo una disminución de la actividad de un 17.5 y 24.5 % en comparación con la leche cruda de oveja y cabra, respectivamente, resultados concordantes con los esperados tras este tratamiento térmico (10 ± 30) % [Korhonen, 2000].

Como era de esperar, los niveles de IgGs encontrados en las muestras de calostro fueron superiores a 1 mg mL^{-1} . La variabilidad del contenido de IgGs en calostros ovinos y caprinos puede atribuirse a distintos factores. En primer lugar, el calostro es la forma de leche secretada durante los primeros días después del parto, de composición similar a la leche cruda, pero con contenido 50 a 100 veces mayor de proteínas del suero, sin embargo, estos valores disminuyen significativamente durante los 7 días después del parto. Además, existen otros factores que afectan a la concentración de IgGs en estas muestras, incluyendo la estación en la que tiene lugar el parto, el número de tomas, la duración del periodo seco, el intervalo entre partos, el volumen de calostro producido, las infecciones bacterianas superadas por el animal, la edad, la raza, etc. [Conesa, 2005], [Levieux, 2002], [Galan-Malo, 2014].

Teniendo en cuenta la importancia en la industria lechera de detectar adulteraciones con leche de otra especie animal, se evaluó el potencial de las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la detección de las adulteraciones más comunes: adulteración de leche de oveja, cabra o búfala con leche de vaca (Fig. 4.42, a), adulteración de leche de vaca o cabra con leche de oveja (Fig. 4.42, b) y adulteración de leche de oveja con leche de cabra (Fig. 4.42, c), a través de la determinación individual de las IgGs bovinas, ovinas y caprinas, respectivamente. Para ello, se analizaron distintas muestras de leche, sin suplementar o suplementadas con 0.1 y 0.5 % de leche de otras especies con las plataformas inmunosensoras desarrolladas tras diluirlas 100 veces con la solución bloqueante de caseína (dilución para la que se ha confirmado previamente la ausencia de efecto matriz). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.42.

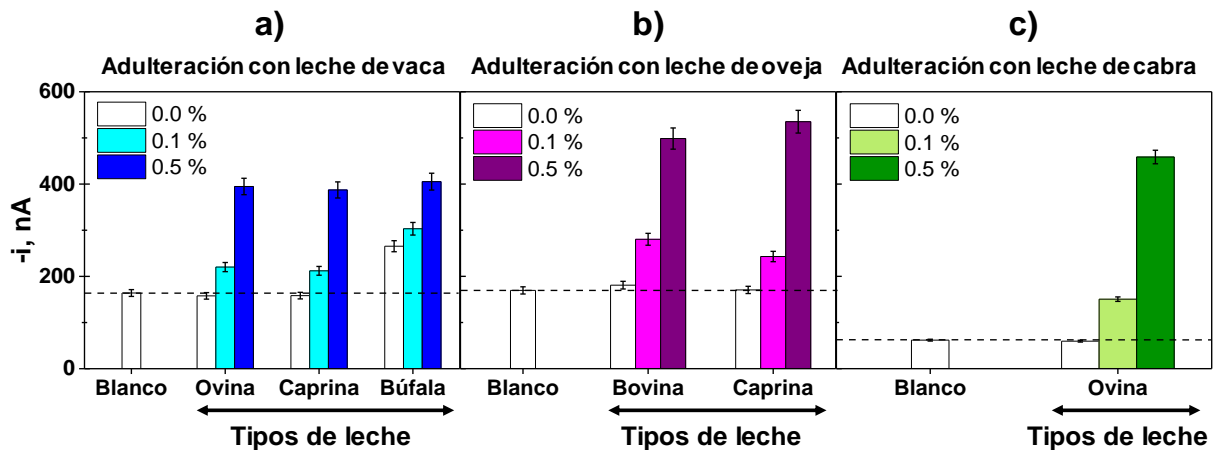


Fig. 4.42: Respuestas amperométricas obtenidas con las plataformas inmunosensoras desarrolladas para la determinación de IgGs bovinas (a), ovinas (b) y caprinas (c) en el análisis de muestras de leche cruda sin suplementar o suplementadas con 0.1 y 0.5 % de leche de vaca a), oveja b) o cabra c). Muestras de leche diluidas 100 veces en solución bloqueante de caseína. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos demuestran la detección inequívoca de la presencia de 0.1 % de leche de vaca (Fig. 4.42, a), oveja (Fig. 4.42, b) o cabra (Fig. 4.42, c) en muestras de leche de distinto origen animal, empleando la detección de las IgGs específicas del animal como biomarcador de adulteración. Resulta destacable además, que las respuestas amperométricas obtenidas en el análisis de las muestras de leche libres de adulteración (Fig. 4.42, barras blancas, 0.0 %) resultaron de magnitud similar a las obtenidas para cada inmunosensor en ausencia de estándares de IgG (Fig. 4.42, Blanco), salvo en el caso de la leche de búfala con el inmunosensor para la determinación de IgGs de vaca, lo que puede atribuirse a la existencia de reactividad cruzada por la proximidad evolutiva entre estas dos especies animales. Es importante aclarar que esto no supuso ninguna limitación en la identificación de muestras de leche de búfala adulteradas con tan sólo un 0.1 % de leche de vaca.

Cabe destacar en este punto, que los valores detectados son 10 veces inferiores al nivel actual establecido por la UE para la identificación de adulteración con leche de vaca (1.0 % (Reglamento (CE) nº 150/2018 de la Comisión)) [Harley, 2016], [Galan-Malo, 2018] y similar a los LDs que proporcionan los kits ELISA comerciales que emplean los mismos inmunoreactivos. Sin embargo, la mayor sensibilidad alcanzada en la detección de estándares de IgGs (Tabla 4.17), en comparación con la metodología ELISA, permite concluir que un estudio exhaustivo de los LDs de estas plataformas

inmunosensoras electroquímicas en la detección de leche de vaca, oveja o cabra, y el empleo de diluciones inferiores, podría reducir en gran medida los valores obtenidos, haciendo que las características analíticas de las inmunoplateformas desarrolladas resulten todavía más competitivas.

4.2.2.5. Detección de adulteraciones con calostro a través de la determinación del contenido total de IgGs en leche

Teniendo en cuenta la mayor concentración de IgGs en calostro y que su presencia en leche reduce la eficacia de los tratamientos térmicos empleados y afecta al proceso de fermentación y maduración del queso [Levieux, 2012], [Conesa, 2005], se evaluó la posibilidad de desarrollar una metodología sencilla para la identificación de calostros en productos lácteos. Para ello, se evaluó la posibilidad de llevar a cabo la detección de los niveles totales de IgGs, suponiendo la suma de las IgGs bovinas, ovinas y caprinas, obtenidos a partir de los inmunosensores amperométricos desarrollados para la determinación individual de IgGs de vaca, oveja o cabra.

En primer lugar, se evaluaron cuatro protocolos diferentes basados en el empleo combinado de las tres estrategias individuales desarrolladas previamente, para la determinación del contenido total de IgGs:

- Protocolo 1: se llevó a cabo la formación de los inmunocomplejos de manera individual para cada una de las 3 especies animales,
- Protocolo 2: se realizó la incubación de cada inmunocaptor (anti-(X)-MBs) con 25 μ L de cada IgG específica suplementada con los 3 anticuerpos de detección,
- Protocolo 3: se llevó a cabo la incubación de una mezcla de los tres inmunocaptadores con 25 μ L de cada IgG específica suplementada con los 3 anticuerpos de detección o,
- Protocolo 4: se realizó la incubación de la mezcla de los tres inmunocaptadores con 25 μ L de la mezcla de las tres IgGs suplementadas con los 3 anticuerpos de detección.

Los diagramas esquemáticos y los resultados obtenidos para cada protocolo evaluado se muestran en la Fig. 4.43.

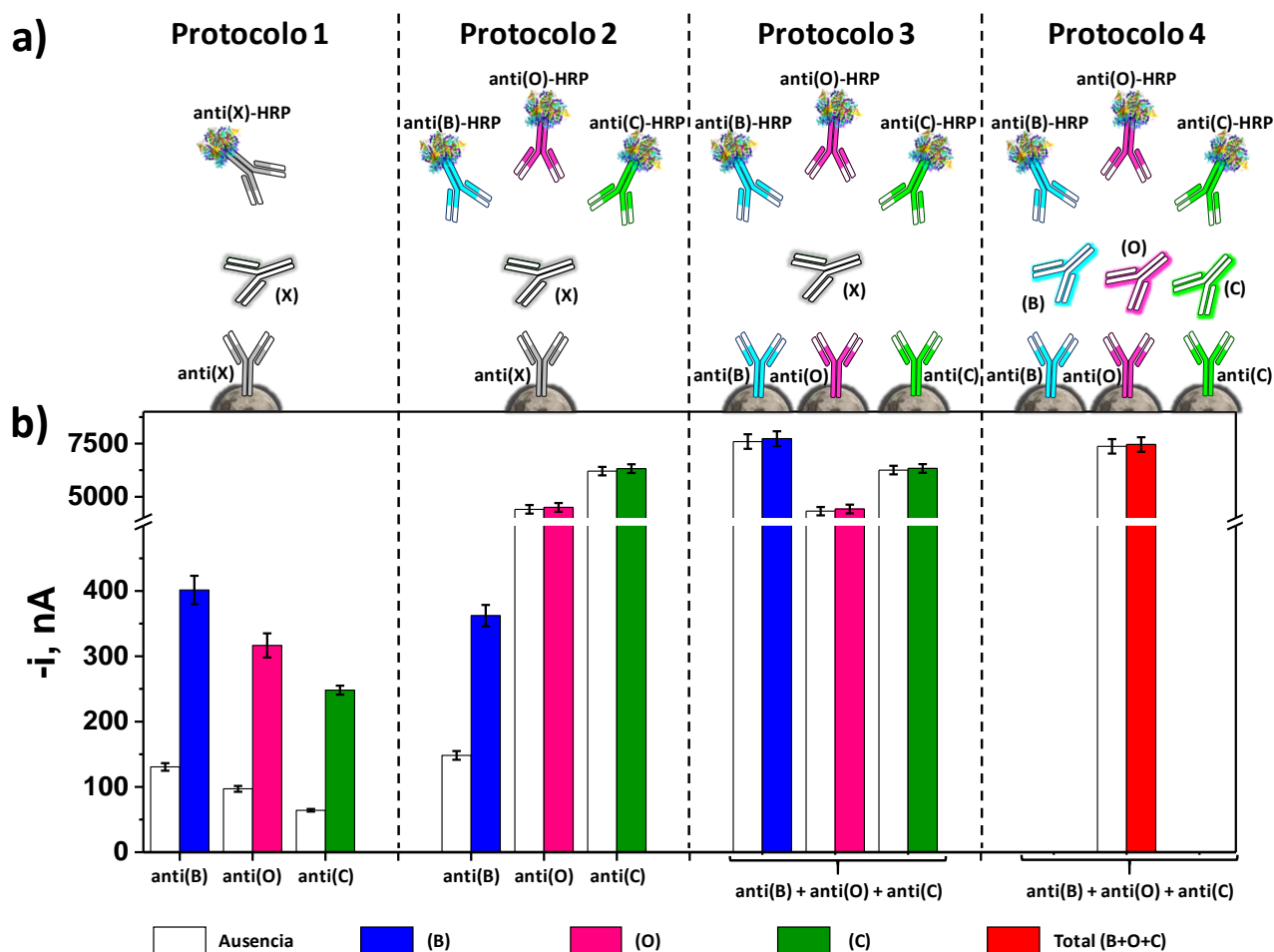


Fig. 4.43: a) Diagramas esquemáticos y b) respuestas amperométricas obtenidas con cada uno de los protocolos ensayados en la determinación de 0.0 (barras blancas) o 100.0 ng mL⁻¹ de estándares de IgGs bovinas (B, barras azules), ovinas (O, barras violetas), caprinas (C, barras verdes) o totales (barras rojas), empleando los inmunosensores desarrollados. X: representa cualquiera de los inmunoreactivos para cada tipo de IgG. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar (n = 3).

Estos resultados demuestran el reconocimiento no específico, entre los anticuerpos de captura y detección para IgGs de oveja y cabra, cuando se emplean de forma conjunta (Fig. 4.43, protocolos 2–4). En este punto, es importante explicar que los inmunoreactivos empleados fueron diseñados para la detección individual de cada IgG diana, sin ser contemplado su empleo junto a otros inmunoreactivos. A la vista de estos resultados, se seleccionó el protocolo 1 para la determinación del contenido total de IgGs, realizando la modificación independiente de 1 µL de cada inmunocaptor con los estándares o muestras suplementados con cada anticuerpo de detección, y depositando de forma conjunta los tres tipos de MBs con los inmunocomplejos tipo sándwich sobre el electrodo de trabajo del SPCE para realizar la detección amperométrica.

La metodología desarrollada se aplicó a la identificación de adulteraciones con calostro. Para ello, se seleccionó como valor de corte 1 mg mL^{-1} de contenido total de estándares de IgGs [Conesa, 2005], [Levieux, 2002], [Galan-Malo, 2014] para la discriminación entre leche cruda sin adulterar o adulterada con calostro. Los resultados obtenidos en el análisis de estándares de IgGs y muestras de leche cruda sin adulterar y adulterada con calostro en el intervalo comprendido entre (5.0–100.0) %, se muestran en la Fig. 4.44.

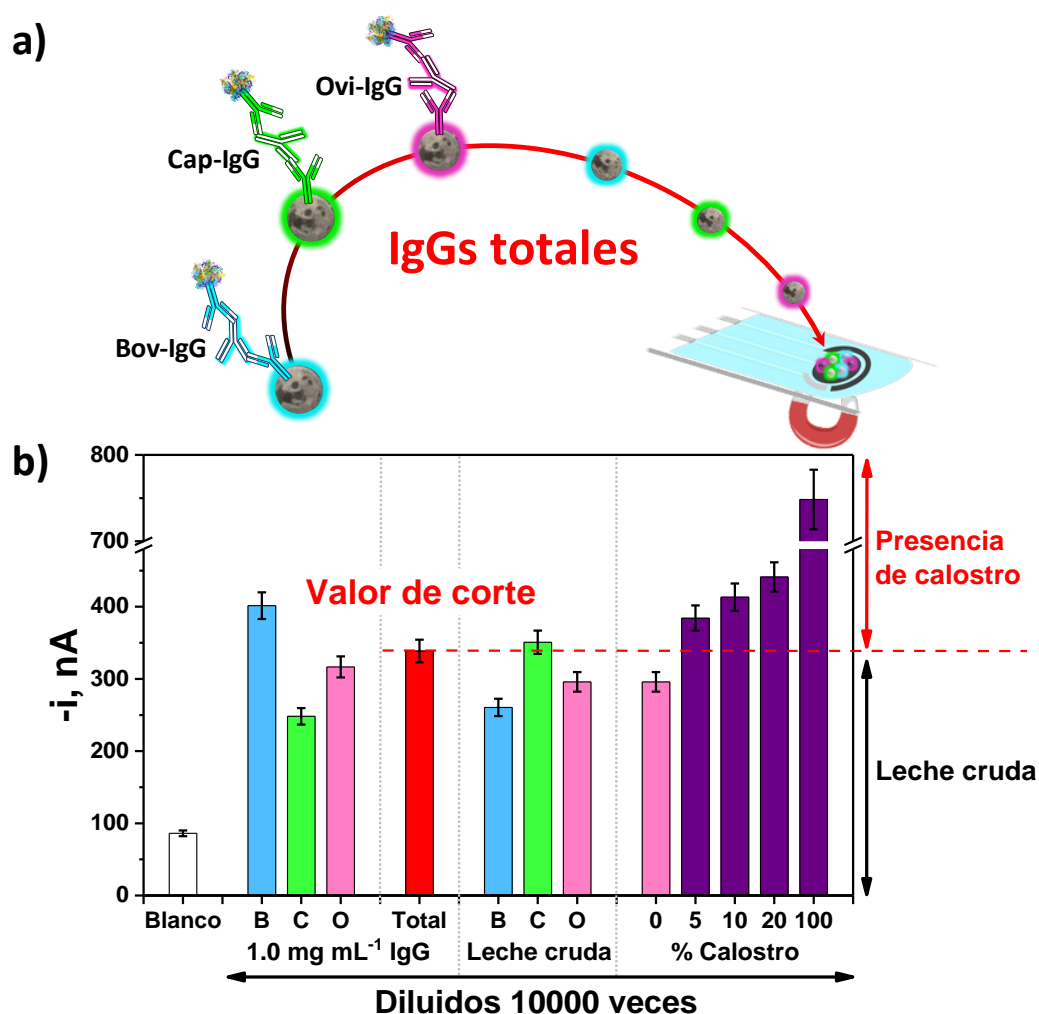


Fig. 4.44: a) Diagrama esquemático de la metodología desarrollada para la determinación del contenido total de IgGs bovinas, ovinas y caprinas empleando un SPCE. b) Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de 1 mg mL^{-1} de estándares de IgGs bovinas (B), ovinas (O) y caprinas (C), y de 1 mg mL^{-1} de la mezcla de las 3 IgGs (Total, valor de corte, $\approx 0.33 \text{ mg mL}^{-1}$ de cada una), en el análisis de muestras de leche cruda de vaca (B), oveja (O) y cabra (C), y de leche cruda de oveja suplementada con calostro ovino en el intervalo comprendido entre (5.0–100.0) %. Tanto los estándares como las muestras de leche se han diluido 10000 veces en disolución bloqueante de caseína para realizar la determinación. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados mostrados (Fig. 4.44, b) demuestran la obtención de respuestas amperométricas en la detección de 1 mg mL^{-1} de mezcla de estándares de IgGs ($\approx 0.33 \text{ mg mL}^{-1}$ de cada una) similares a la media de los valores obtenidos para cada IgG específica, por lo que seleccionó este como valor de corte para la discriminación entre leche cruda sin adulterar o adulterada con calostro.

Las respuestas amperométricas obtenidas en el análisis de muestras de leche cruda resultaron iguales (leche cruda caprina (1.1 ± 0.2) mg mL^{-1} IgG caprina) o inferiores al valor de corte, observando una clara discriminación entre el valor de corte o de leche ovina sin adulterar y adulterada con un (5.0–100.0) % de calostro ovino. Es importante destacar, además, que los niveles de calostro detectados son los considerados de relevancia en la industria lechera (la presencia de un 20.0 o 5.0 % de calostro de vaca o cabra, respectivamente, causan problemas tecnológicos en la producción de queso [Conesa, 2005], [Levieux, 2002], [Galan-Malo, 2014]). La fiabilidad de la metodología se ha evaluado empleando deliberadamente calostro ovino, debido a su mayor dificultad de detección por los bajos niveles de IgGs que presenta en comparación con los calostros de otros rumiantes (véase Tabla 4.18).

Los resultados obtenidos demuestran el potencial de la metodología desarrollada para su empleo como una novedosa herramienta electroanalítica eficaz y rápida (30 min) para el cribado de productos lácteos frente a adulteraciones con calostro de las principales especies empleadas en esta industria.

4.2.2.6. Plataforma multiplexada de cribado para identificación del origen, detección de adulteraciones entre especies e identificación de la presencia de calostro en leche

El potencial de las plataformas individuales desarrolladas para la detección de adulteración con los principales tipos de leche empleados en la industria lechera y en la identificación de calostros, se explotó en el desarrollo de una plataforma inmunosensora para multiplexado, basada en el empleo de SPC4Es que, en una única medida, es capaz de proporcionar información sobre el origen animal de una muestra de leche, el

tratamiento térmico que ha sufrido y si ha sido objeto de adulteraciones con leche de otras especies animales o calostro.

Para ello, se emplearon los inmunocaptadores desarrollados para la detección de IgGs bovinas, ovinas y caprinas, o para la detección de IgGs totales, y se capturaron magnéticamente, de forma individual, sobre cada uno de los cuatro electrodos de trabajo del SPC4Es (W1: inmunosensor para IgGs bovinas, W2: inmunosensor para IgGs ovinas, W3: inmunosensor para IgGs caprinas y W4: metodología para la detección del contenido total de IgGs, Fig. 4.45, a). La plataforma multisensora desarrollada se empleó en el análisis de una muestra de leche de oveja (diluida 100 veces (W1–W3) o 10000 veces (W4)) sin adulterar I) y adulterada con: 1.0 % de leche de vaca cruda II), 1.0 % de leche de cabra cruda III) y 20.0 % de calostro ovino IV). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.45.

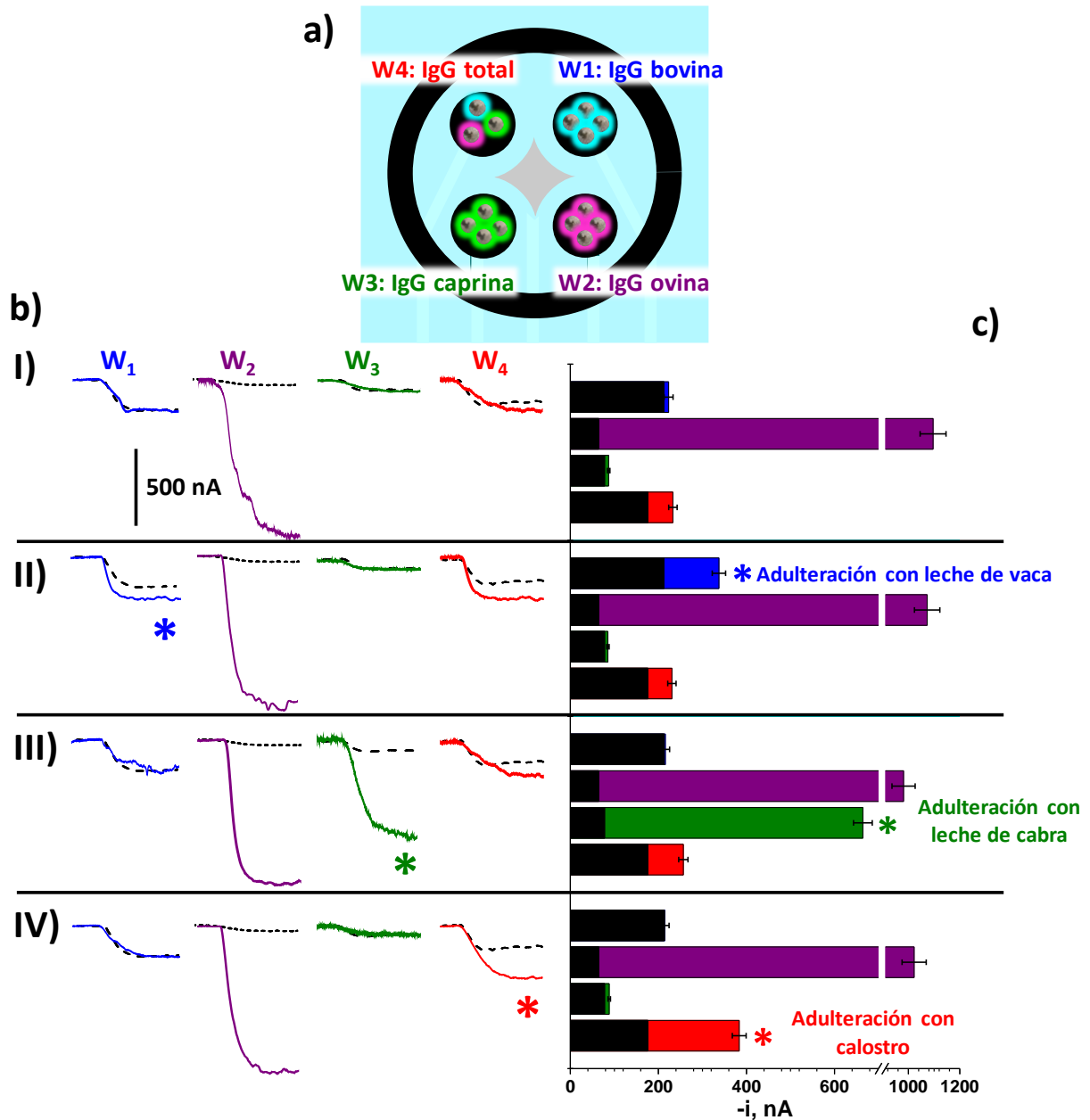


Fig. 4.45: a) Plataforma inmunosensora para la detección multiplexada de IgGs bovinas (W1, MBs, líneas y barras azules), ovinas (W2, MBs, líneas y barras moradas), caprinas (W3, MBs, líneas y barras verdes) y totales (W4, líneas y barras rojas) basada en el empleo de un SPC4Es. Amperogramas reales b) y respuestas amperométricas c) obtenidas con la plataforma inmunosensora multiplexada en el análisis de muestras de leche cruda de oveja (diluída 100 (W1–W3) o 10000 veces (W4)) sin adulterar I) o adulterada con: 1.0 % de leche cruda de vaca II), 1.0 % de leche cruda de cabra III) y 20.0 % de calostro ovino IV). Se incluyen con fines comparativos los amperogramas (líneas punteadas negras) y respuestas amperométricas (barras negras) obtenidas en ausencia de estándares de IgGs o muestras de leche. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos (Fig. 4.45) demuestran la ausencia de reactividad cruzada entre las IgGs evaluadas y de difusión de las especies electroactivas involucradas entre los electrodos adyacentes, confirmando la viabilidad de la plataforma inmunosensora desarrollada para el análisis multiplexado, con objeto de identificar, tanto el tipo, como el tratamiento que ha sufrido la leche y asegurar su autenticidad. Resulta destacable la obtención de respuestas amperométricas significativamente diferentes a las obtenidas en ausencia de estándares de IgGs (Fig. 4.45, b y c, líneas y barras negras) únicamente para las muestras adulteradas con un 1.0 % de leche de vaca (Fig. 4.45, W1, muestra II) o cabra (Fig. 4.45, W3, muestra III) o con un 20.0 % de calostro ovino (Fig. 4.45, W4, muestra IV), mediante la detección de las IgGs bovinas, caprinas o totales, respectivamente.

Estos resultados culminan exitosamente los objetivos y resultados mostrados en este apartado, demostrando el potencial de la plataforma multisensora desarrollada para la detección fiable, en sólo 30 min, de adulteraciones con leche o calostro de vaca, oveja y cabra a los niveles exigidos por la legislación europea (1.0 % (Reglamento (CE) nº 273/2008 de la Comisión)) [Harley, 2016], [Galán-Malo, 2018].

Todas las plataformas inmunosensoras amperométricas desarrolladas en este apartado resultan competitivas con las metodologías ELISAs empleadas, comúnmente, en términos de simplicidad, coste, tiempo de ensayo, viabilidad para el multiplexado y portabilidad de la instrumentación requerida. Estas características hacen que estas plataformas se ofrezcan como herramientas especialmente atractivas de cribado rutinario de muestras de leche para su uso en entornos descentralizados (granjas, camiones cisterna e industrias lecheras) y su manejo por personal poco especializado, con el fin de garantizar la ausencia de adulteraciones y el correcto etiquetado de productos lácteos.

4.3. Desarrollo de plataformas genosensoras electroquímicas para la determinación de marcadores genéticos de alérgenos y fraudes alimentarios

En este apartado se recogen los resultados obtenidos en el desarrollo de genosensores amperométricos, basados en el empleo de MBs y SPCE para la detección de fragmentos característicos de ADN para la detección de avellana y adulteraciones con carne de caballo.

4.3.1. Genosensor para la detección de la secuencia de ADN que codifica la proteína alergénica *Cor a 9* de la avellana

En este apartado se discuten los resultados más relevantes del artículo: *Ruiz-Valdepeñas Montiel et al. Amperometric determination of hazelnut traces by means of Express PCR coupled to magnetic beads assembled on disposable DNA sensing scaffolds. Sens. Actuators B-Chem. 245 (2017) 895–902*, aportado como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

Se discuten a continuación los resultados más relevantes obtenidos en el desarrollo de una plataforma genosensora, como metodología rápida, sensible, selectiva y de fácil manejo para la determinación de un fragmento de ADN característico de la secuencia que codifica la proteína alergénica *Cor a 9* de la avellana (secuencia *Cor a 9*), con el fin de detectar su contenido en muestras alimentarias.

La alergia a la avellana tiene una incidencia del 7.2 % en la población mundial, provocando respuestas alérgicas bastante variables, desde reacciones locales y leves, hasta sistémicas y graves, lo que hace que la avellana sea considerada por la FAO/OMS (Comisión del Codex Alimentarius, 1999) y la Comisión Europea (2006) uno de los alérgenos más peligrosos [Poms, 2004], [Flinterman, 2008].

La metodología desarrollada está basada en el uso de SPCEs y MBs funcionalizadas con estreptavidina (Estrep-MBs) como μ -soportes sólidos para la construcción del genosensor basado en un formato de hibridación tipo sándwich, empleando sondas de captura (b-Cp) y de detección (b-Dp) biotiniladas complementarias a la secuencia *Cor a 9* (secuencia sintética o producto de amplificación por PCR). Para ello, las Estrep-MBs se modificaron con la b-Cp, realizando posteriormente la captura de la secuencia *Cor a 9* en una única etapa de 15 min, mediante la incubación de los genocaptadores magnéticos (b-Cp-MBs) con las muestras de interés suplementadas con b-Dp y estreptavidina-HRP (Estrep-HRP) para la captura y marcaje enzimático del homohíbrido tipo sándwich formado. Para la obtención de las medidas amperométricas, las MBs resultantes se capturan magnéticamente sobre el electrodo de trabajo del SPCE y se monitoriza la reducción de la benzoquinona (BQ) (*vs.* electrodo de pseudoreferencia de Ag/AgCl) generada por oxidación de la HQ cuando se reduce el H_2O_2 en presencia de HRP.

Los fundamentos de la plataforma genosensora implementada, su acoplamiento a estrategias de amplificación por PCR, la captura magnética de las MBs con los homohíbridos tipo sándwich de ADN marcados con HRP sobre la superficie de los SPCEs y la transducción amperométrica en presencia del sistema H_2O_2 /HQ, se muestran de forma esquemática en la Fig. 4.46.

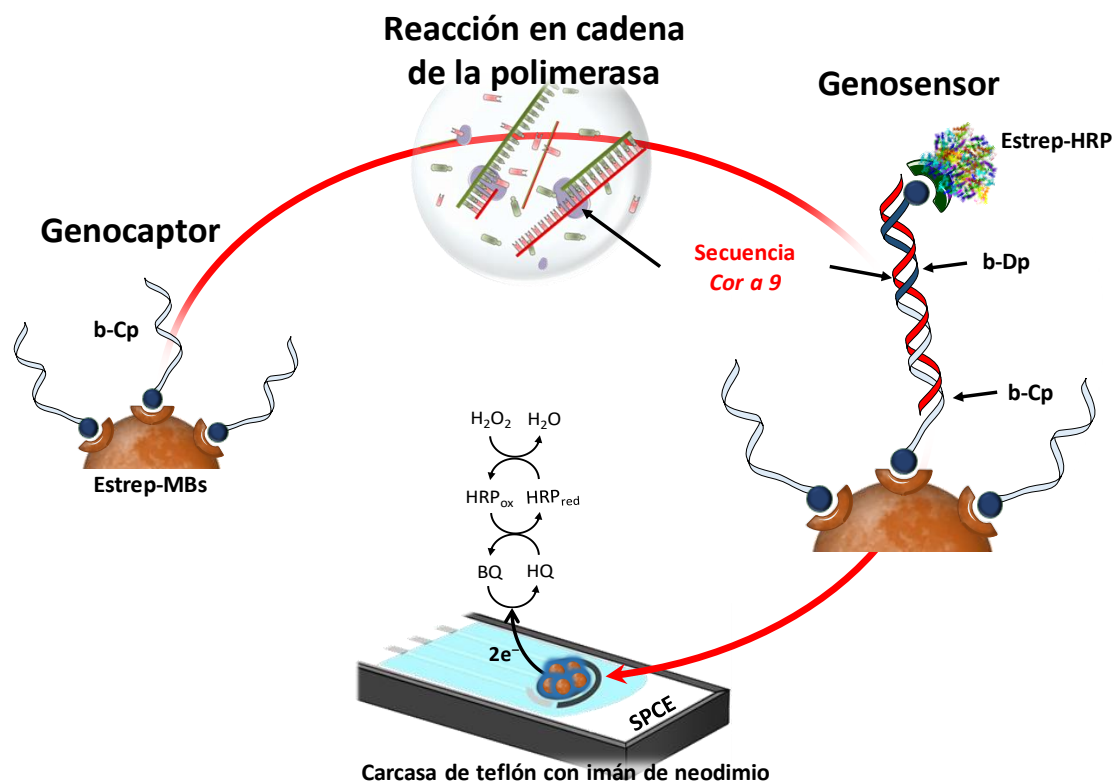


Fig. 4.46: Diagrama esquemático de la plataforma genosensora desarrollada para la determinación de un fragmento característico de la secuencia que codifica la proteína alergénica Cor a 9 de la avellana. Etapas involucradas en la amplificación de la secuencia de ADN de interés por PCR y su captura, detección y marcaje enzimático en una etapa sobre genocaptadores magnéticos (b-Cp-MBs). Detección amperométrica y reacciones enzimáticas implicadas en la reducción enzimática del H_2O_2 mediada por HQ.

4.3.1.1. Características operacionales y analíticas

En primer lugar, se evaluó la viabilidad del empleo de formatos de hibridación tipo sándwich en el desarrollo de genosensores electroquímicos, basados en el uso de sondas biotiniladas de 25-mer, Estrep-MBs y un conjugado comercial de Estrep-HRP para la detección de una secuencia sintética de ADN de 50-mer. Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 y 0.5 nM de la secuencia diana sintética empleando MBs sin modificar y modificadas con la b-Cp empleando dos medios de hibridación distintos: disolución reguladora de Tris-HCl (0.1 M, pH 7.2) y una solución comercial bloqueante de caseína (PBS + 1 % caseína, pH 7.4).

Los resultados obtenidos, mostrados en la Fig. 4.47, demuestran la obtención de respuestas amperométricas significativamente diferentes en presencia de la secuencia sintética diana únicamente cuando se empleaban MBs modificadas con la sonda de captura (b-Cp-MBs), resultados que aseguran la captura selectiva del híbrido b-Dp/secuencia *Cor a 9*/b-Cp y la ausencia de adsorciones inespecíficas de los bioreactivos empleados sobre la superficie de las MBs. Resulta destacable, además, la mejora significativa de sensibilidad observada cuando se lleva a cabo la hibridación y marcaje enzimático en la solución comercial bloqueante de caseína. Estos resultados pueden atribuirse al efecto positivo de la caseína para desenrollar las secuencias de oligonucleótidos, mejorando la eficiencia de la hibridación y minimizando las adsorciones inespecíficas del trazador enzimático.

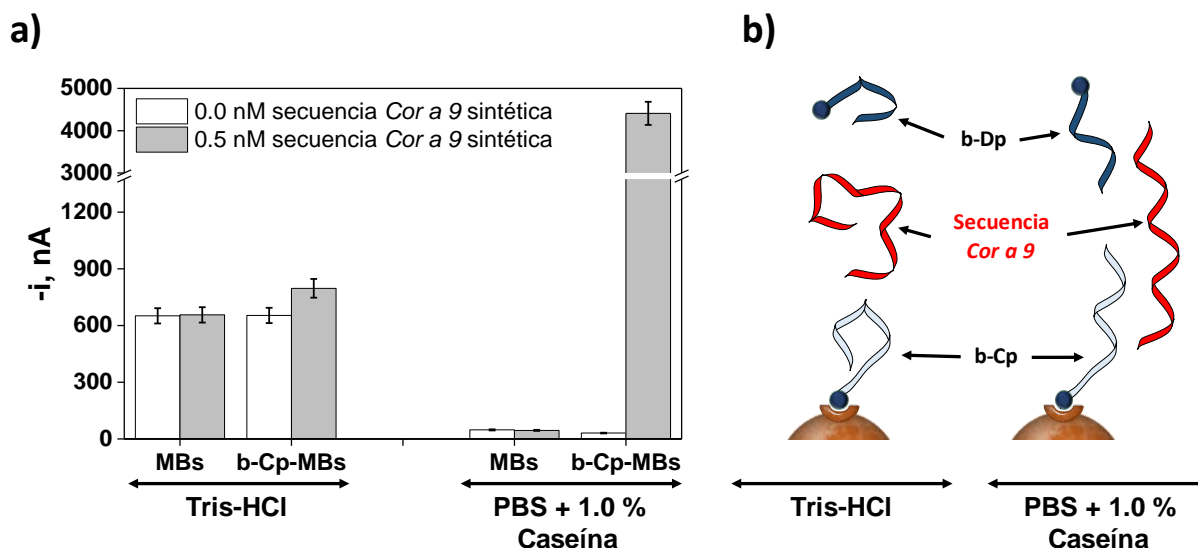


Fig. 4.47: a) Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (barras blancas) y presencia de 0.5 nM de la secuencia *Cor a 9* sintética (barras grises) preparando la mezcla de hibridación en Tris-HCl (0.1 M, pH 7.2) o en solución comercial bloqueante de caseína (PBS + 1 % caseína, pH 7.4), empleando MBs sin modificar (MBs) y modificadas con la sonda de captura (b-Cp-MBs) y b) diagramas esquemáticos del proceso de hibridación en cada medio evaluado. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Tras confirmar la viabilidad del formato de hibridación tipo sándwich en el que se fundamenta el genosensor amperométrico desarrollado, se optimizaron de forma sistemática las diferentes variables involucradas en su fabricación, tomando como criterio la mejor relación (S (0.5 nM de secuencia *Cor a 9* sintética)/B). Todas las

variables evaluadas, así como los valores óptimos para la fabricación del genosensor amperométrico se resumen en la Tabla 4.19. Otras variables involucradas en el proceso de detección amperométrica, como las concentraciones de H₂O₂ e HQ y el potencial de detección a aplicar (-0.20 V vs. electrodo de referencia de Ag/AgCl), se optimizaron en trabajos anteriores realizados en el Grupo de Investigación [Conzuelo, 2012-a], [Eguílaz, 2010], [Gamella, 2012].

Tabla 4.19. Variables experimentales optimizadas, intervalos evaluados y valores seleccionados como óptimos en el desarrollo de la plataforma genosensora desarrollada para la determinación amperométrica de avellana a través de un fragmento característico de la secuencia Cor a 9.

Variable experimental	Intervalo evaluado	Valor seleccionado
V _{Estrep-MBs} , μL	2.5 – 10.0	5.0
[b-Cp], μM	0.001 – 10.0	0.1
Tiempo de incubación de MBs con b-Cp, min	15 – 90	15
[b-Dp], μM	0.0025 – 5.0	0.25
Estrep-HRP, mU μL^{-1}	–	0.5 ^a
Medio de hibridación	Tris-HCl – PBS + 1% caseína	PBS + 1% caseína
Número de etapas	1 – 3	1
Tiempo de análisis, min	5 – 60	15
Número de lavados previos a medida amperométrica	2 – 5	2

^aVariables optimizadas en trabajos previos del Grupo de Investigación [Esteban-Fernández de Ávila, 2013].

A modo de ejemplo se discuten, con un poco más de detalle, los estudios obtenidos en dos de estas variables experimentales, como son el número de etapas y el tiempo de incubación de las b-Cp-MBs con la mezcla que contiene la secuencia sintética Cor a 9, b-Dp y Estrep-HRP.

La evaluación del número de etapas implicadas en la determinación se llevó a cabo empleando los siguientes procedimientos a partir de los genocaptore preparados (b-Cp-MBs) y empleándose en todos los casos etapas de incubación de 30 min:

- una etapa (1): que implica la incubación de los genocaptore en una disolución mezcla que contiene la secuencia sintética *Cor a 9*, b-Dp y Estrep-HRP;
- dos etapas (2): que implican la formación del híbrido tipo sándwich en una primera etapa, mediante la incubación de los genocaptore con una disolución mezcla de la secuencia *Cor a 9* y b-Dp y una segunda etapa para su marcaje enzimático mediante su incubación con Estrep-HRP; y
- tres etapas (3): que involucran la incubación secuencial de los genocaptore con la secuencia sintética *Cor a 9*, b-Dp y Estrep-HRP.

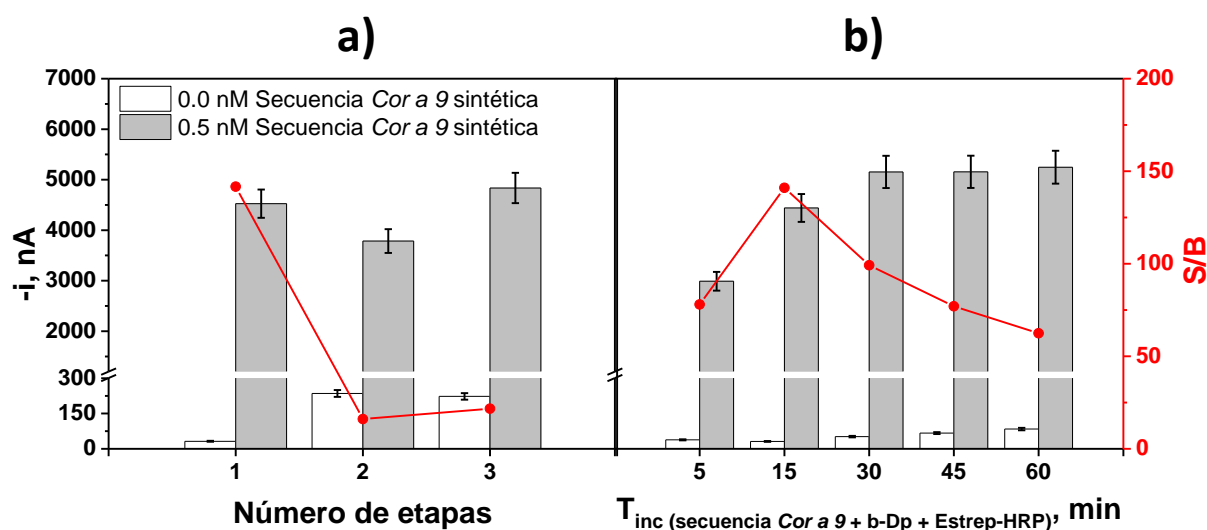


Fig. 4.48: Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y presencia de estándares de 0.5 nM de la secuencia *Cor a 9* sintética (S, barras grises) y la relación de señales resultante (S/B, línea roja) con el número de etapas de incubación empleadas para la modificación de las MBs a) y con el tiempo de incubación de las b-Cp-MBs con la disolución mezcla que contiene la secuencia sintética *Cor a 9*, b-Dp y Estrep-HRP b). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos en la evaluación del número de etapas (Fig. 4.48, a) demuestran que cuando se emplea una única etapa se alcanza la mayor relación S/B como consecuencia de las menores respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de la secuencia diana. Esto puede deberse a que la formación del complejo

(b-Dp)₄-Estrep-HRP en disolución, cuando se emplean conjuntamente, minimiza la adsorción inespecífica de la Estrep-HRP libre sobre la superficie de las MBs.

En el estudio del tiempo de incubación (Fig. 4.48, b) de las b-Cp-MBs con la disolución mezcla que contiene la secuencia sintética *Cor a 9*, b-Dp y Estrep-HRP, que se evaluó entre 5 y 60 minutos, se observó un aumento de la relación S/B hasta 15 min, que disminuía acusadamente cuando se empleaban tiempos de incubación superiores, debido posiblemente a fenómenos de agregación que dificultan los procesos de hibridación. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó un tiempo de incubación de 15 minutos.

Es importante destacar en este punto que, de acuerdo con los estudios de optimización realizados, la metodología desarrollada permite realizar la determinación en una única etapa de 15 min.

Trabajando en las condiciones experimentales optimizadas se obtuvo la curva de calibrado para la secuencia sintética *Cor a 9* que se muestra en la Fig. 4.49.

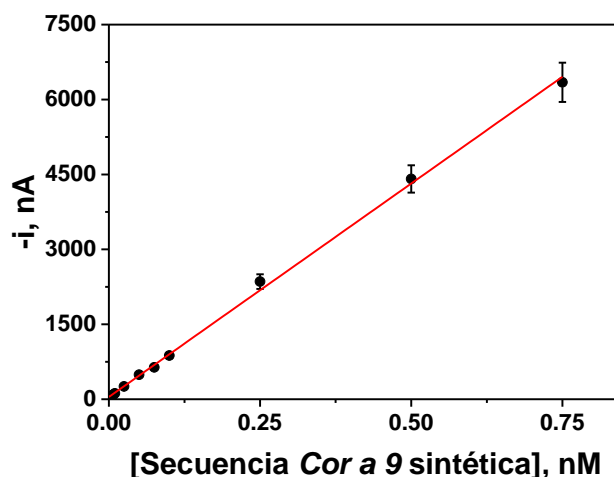


Fig. 4.49: Calibrado obtenido para la determinación amperométrica de estándares de la secuencia sintética *Cor a 9* con el genosensor desarrollado. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados obtenidos demuestran una dependencia lineal de las respuestas amperométricas con la concentración de la secuencia sintética diana en el intervalo de concentración comprendido entre (0.0024–0.75) nM ($r = 0.998$), con una pendiente de

$(8546 \pm 88) \text{ nA nM}^{-1}$ y una ordenada en el origen de $(46 \pm 23) \text{ nA}$. Los LD y LC obtenidos, de 0.72 y 2.4 pM, respectivamente, se estimaron a partir de la desviación estándar de 10 señales amperométricas obtenidas en ausencia de la secuencia diana y empleando la pendiente del calibrado mostrado en la Fig. 4.49 (criterios $3 \times s_b/m$ y $10 \times s_b/m$, respectivamente).

La reproducibilidad de la plataforma desarrollada se evaluó comparando las respuestas amperométricas obtenidas empleando ocho lotes de genocaptadores diferentes preparados de la misma manera, para la determinación de estándares de 0.5 nM de la secuencia sintética diana, obteniéndose un valor de $\text{RSD} = 6.2 \%$. Estos resultados confirman la reproducibilidad de los protocolos empleados, tanto para la modificación de las MBs con los homohíbridos de ADN tipo sándwich marcados enzimáticamente y su captura magnética sobre la superficie del SPCE, como para la transducción amperométrica.

Además, la estabilidad de almacenamiento de las b-Cp-MBs se evaluó tras su almacenamiento en B&W filtrado a 4 °C. Para ello, se compararon las relaciones S (0.5 nM de la secuencia *Cor a 9*)/ B resultantes cada día de control, empleando los genocaptadores almacenados. Los resultados obtenidos demostraron la posibilidad de su empleo sin pérdida significativa de sensibilidad durante al menos 30 días (no se ensayaron tiempos superiores). Estos resultados confirman la estabilidad de la interacción biotina-estreptavidina para la fabricación sencilla, rápida, reproducible y estable de genocaptadores magnéticos.

En la Tabla 4.20 se comparan las características analíticas proporcionadas por la plataforma genosensora amperométrica desarrollada para la determinación de estándares de la secuencia sintética *Cor a 9*, preparados en solución bloqueante de caseína y en Tris-HCl (0.1 M, pH 7.2).

Tabla 4.20. Características analíticas obtenidas con las plataformas genosensoras desarrolladas para la determinación amperométrica de estándares de la secuencia sintética *Cor a 9*, preparados en Tris-HCl (0.1 M, pH 7.2) o en solución bloqueante de caseína.

Parámetro	Tris-HCl (0.1 M, pH 7.2)	Solución bloqueante de caseína
r	0.999	0.998
Pendiente, nA nM ⁻¹	(200 ± 2)	(8546 ± 88)
Ordenada en el origen, nA	(626 ± 28)	(46 ± 23)
Intervalo lineal, nM	1.5 – 50.0	0.0024 – 0.75
LD, pM	450 (45 fmol)	0.72 (0.072 fmol)
LC, pM	1500 (150 fmol)	2.4 (0.24 fmol)

Resulta destacable la obtención de LDs 3 órdenes de magnitud inferiores cuando se lleva a cabo la captura del híbrido (b-Dp/secuencia *Cor a 9*/bCp) y su marcaje enzimático con Estrep-HRP en solución bloqueante de caseína, en comparación con el obtenido en Tris-HCl (0.72 vs. 450, respectivamente), confirmándose nuevamente la mejora significativa de las prestaciones analíticas en la detección de híbridos de elevada longitud (50-mer) empleando la solución bloqueante de caseína.

4.3.1.2. Determinación de amplicones obtenidos por PCR

Teniendo en cuenta que la avellana es uno de los alérgenos más peligrosos, pudiendo desencadenar reacciones alérgicas graves incluso a niveles de traza, se evaluó la posibilidad de acoplar la plataforma genosensora desarrollada con estrategias de amplificación del material genético mediante PCR, a partir del análisis de los productos de amplificación obtenidos por PCR, y previamente desnaturalizados, con el genosensor desarrollado.

Antes de estudiar la sensibilidad y selectividad del acoplamiento genosensor-PCR, se evaluó la posibilidad de emplear y simplificar el protocolo de PCR descrito por Iniesto y col. para la amplificación de un fragmento de 100 bp del gen *Cor a 9* (que incluye la región diana de 50-mer complementaria a las b-Cp y b-Dp) [Iniesto, 2013],

con el objetivo de desarrollar una herramienta de amplificación-biosensora que permita llevar a cabo la detección sensible de avellana en el menor tiempo posible.

En primer lugar, se estudiaron 4 parejas distintas de cebadores que surgen como combinación del cebador indirecto (C.I) con 4 cebadores directos diferentes (C.D(100) [Iniesto, 2013], C.D(70), C.D(50) y C.D(46)), para la obtención de amplicones de 100, 70, 50 o 46 bp, respectivamente (incluyendo en todos los casos la secuencia complementaria a las b-Cp y b-Dp, Fig. 4.50 en rojo). Los amplicones obtenidos se analizaron directamente con el genosensor desarrollado obteniendo los resultados que se muestran en la Fig. 4.51.

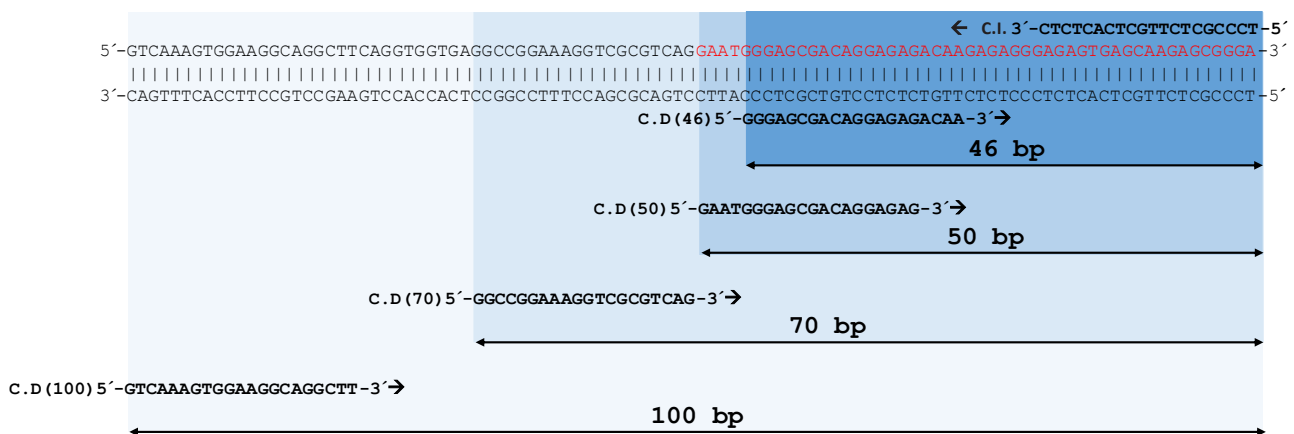


Fig. 4.50: Secuencias de nucleótidos de los amplicones obtenidos en la amplificación por PCR del gen Cor a 9 de la avellana con los cebadores evaluados. Cebadores y tamaño del amplicón en negrita. C.I o C.D: cebadores indirectos o directos, respectivamente. Secuencia Cor a 9 de 50-mer complementaria a las b-Cp y b-Dp en rojo.

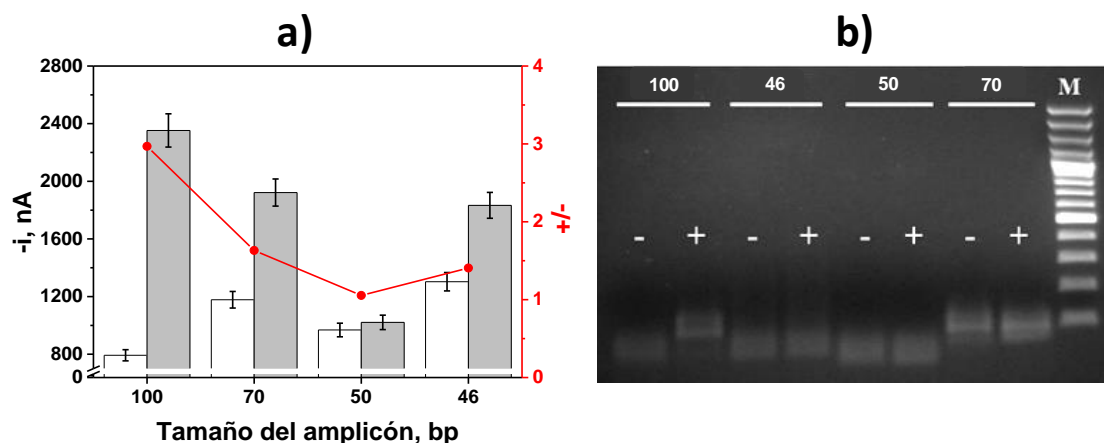


Fig.4.51: a) Respuestas amperométricas obtenidas con los genosensores desarrollados en el análisis de los amplicones resultantes (100–46 bp, diluidos 50 veces en solución bloqueante de caseína) empleando el protocolo de PCR convencional para las diferentes parejas de cebadores (Fig. 4.50), en ausencia (-, barras blancas) y en presencia de 5.0 ng μL^{-1} de ADN genómico de avellana (+, barras grises) y la relación resultante (+/-, línea roja). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$). b) Detección por electroforesis en gel de agarosa (1.8 %) de cada amplicón evaluado.

M: marcador 100 bp.

Los resultados obtenidos en el análisis de los amplicones resultantes de (46–100) bp, para cada pareja de cebadores empleados, demostraron claramente la obtención de la mejor relación (+/-) en el análisis de los amplicones de 100 bp. Estos resultados pueden justificarse por una mayor eficiencia de la amplificación y por la reducción significativa de las asociaciones inespecíficas entre la pareja de cebadores para 100 bp, lo que se corresponde con la reducción significativa de las respuestas amperométricas (Fig. 4.51, a, barras blancas), y de la banda obtenida en el gel de electroforesis (Fig. 4.51, b, -) en ausencia de ADN genómico de avellana. Por consiguiente, se seleccionó la pareja de cebadores C.I y C.D (100) como óptima para estudios posteriores.

También se evaluó la influencia de la temperatura de hibridación entre 50–70 °C, en el protocolo de amplificación empleado. A partir de los resultados obtenidos, empleando electroforesis en gel de agarosa (Fig. 4.52), se seleccionaron 65 °C como temperatura de hibridación óptima, destacando, además, la ausencia de amplificación para temperaturas de hibridación superiores.

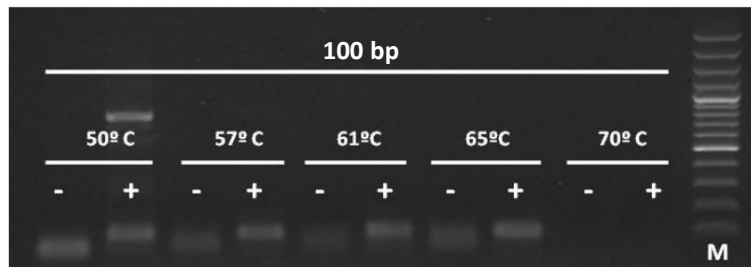


Fig. 4.52: Gel de electroforesis de agarosa (1.8 %) de los amplicones de 100 bp obtenidos por PCR convencional en ausencia (-) y presencia (+) de 5.0 ng μL^{-1} de ADN genómico de avellana, empleando distintas temperaturas de hibridación comprendidas entre 50–70 °C. M: marcador 100 bp.

Por último, se evaluó la posibilidad de reducir el tiempo de amplificación requerido por la PCR convencional ensayada hasta el momento (2 h y 10 min) [Iniesto, 2013] variando, tanto el tiempo de incubación de cada etapa (los programas de PCR empleados se recogen en la Tabla 4.21), como el número de ciclos (30–35).

Tabla 4.21. Especificaciones de los programas de PCR evaluados, realizando 35 ciclos.

Programa	Desnaturalización (94 °C), s	Hibridación (65 °C), s	Elongación (72 °C), s	Tiempo total
1	45	60	60	2 h 10 min
2	30	30	30	1 h 25 min
3	15	15	30	1 h 7 min
4	15	30	–	52 min

Los productos de amplificación obtenidos en función del número de ciclos (30–35) y para cada programa de PCR (Tabla 4.21) se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa (1.8 %), no observando diferencias significativas entre el número de ciclos empleados o el protocolo de amplificación, con excepción del protocolo 4, donde no se obtuvo amplificación en presencia de 5.0 ng μL^{-1} de ADN genómico de avellana. Teniendo en cuenta que uno de los objetivos perseguidos es el desarrollo de metodologías sencillas y rápidas para la detección de la presencia de avellana, se seleccionó como protocolo de amplificación el programa 3 (desnaturalización e hibridación 15 s, cada una, y elongación 30 s) realizando 30 ciclos consecutivos, consiguiendo así reducir el tiempo de amplificación de la PCR convencional a la mitad

(1 h y 7 min vs. 2 h y 10 min), por lo que esta nueva estrategia se conoce, comúnmente, como PCR de tiempo reducido.

En la Fig. 4.53 se comparan los resultados obtenidos para los amplicones que resultan con ambas estrategias de amplificación empleando los genosensores desarrollados y electroforesis en gel de agarosa.

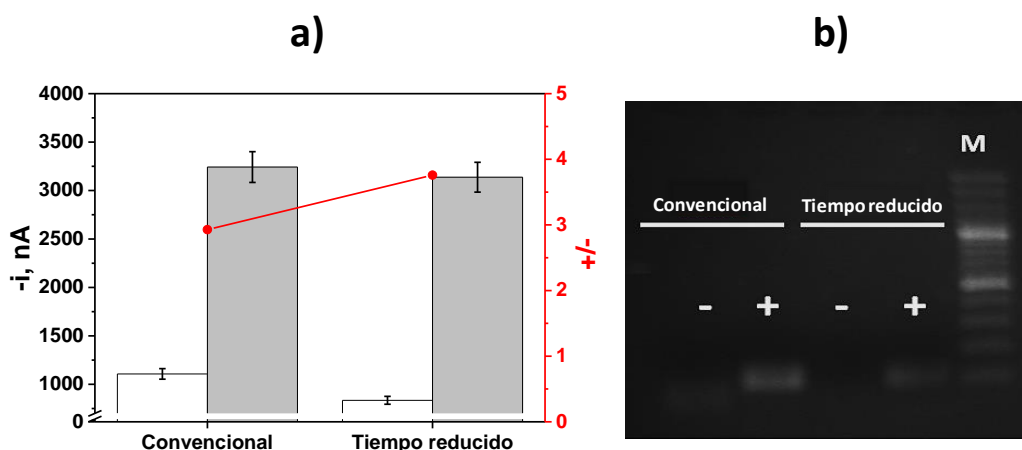


Fig. 4.53: Resultados obtenidos en la comparación de los amplicones obtenidos mediante PCR convencional y de tiempo reducido en ausencia (-, barras blancas) y en presencia de $5.0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN genómico de avellana (+, barras grises). a) Respuestas amperométricas proporcionadas por el genosensor para cada uno de los productos de amplificación diluidos 50 veces en solución bloqueante de caseína. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$). b) Gel de agarosa (1.8 %) y M: marcador de 100 pb.

Como puede observarse (Fig. 4.53), aunque las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de ADN genómico de avellana son similares en ambas estrategias de PCR, el empleo de la PCR de tiempo reducido minimiza las asociaciones entre la pareja de cebadores empleados, y con ello, las adsorciones inespecíficas y las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de ADN de avellana (Fig. 4.53, a, barras blancas), resultados que se confirman por electroforesis en gel de agarosa (Fig. 4.53, b, -). Todo ello se traduce en una mejor relación (+/-) empleando la PCR de tiempo reducido, lo que unido a la reducción del tiempo de análisis, la hace especialmente atractiva para su acoplamiento al genosensor amperométrico desarrollado.

4.3.1.3. Evaluación de la reproducibilidad y selectividad del acoplamiento PCR de tiempo reducido-genosensor

Teniendo en cuenta que el análisis real de muestras alimentarias conllevaría la extracción, amplificación mediante PCR de tiempo reducido y determinación con el genosensor amperométrico desarrollado, se evaluó la reproducibilidad de la metodología global en el análisis de los amplicones obtenidos empleando $5.0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN genómico extraído de distintos lotes de avellana de una misma variedad (Negreta) y de diferentes variedades de avellana (Negreta, Tonda di Giffoni, Pauetet y San Giovanni). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.54.

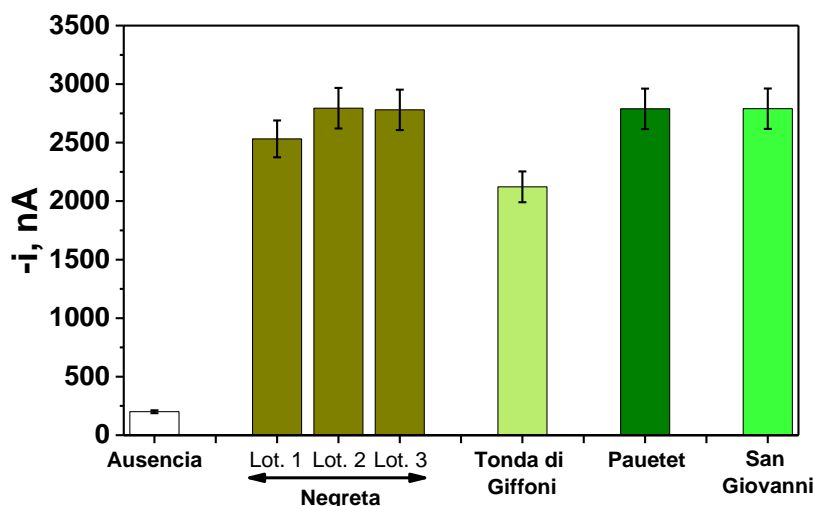


Fig. 4.54: Respuestas amperométricas obtenidas con el genosensor desarrollado en el análisis de los amplicones obtenidos empleando PCR de tiempo reducido (diluidos 50 veces en solución bloqueante de caseína) en ausencia y presencia de $5.0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN genómico de diferentes extractos de avellana de la misma variedad y de distintas variedades. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados obtenidos (Fig. 4.54) demostraron la obtención de respuestas amperométricas similares en el análisis de diferentes lotes de una misma variedad de avellana, lo que confirma la fiabilidad y reproducibilidad de todas las etapas que conlleva la metodología desarrollada. Resulta destacable, además, la posibilidad de determinar inequívocamente la presencia de avellana, independientemente de su variedad.

También se evaluó la reproducibilidad del acoplamiento PCR en tiempo reducido-genosensor, obteniéndose los valores de RSD de:

- 6.9 % (n=3) en el análisis del mismo amplicón obtenido en presencia de 5.0 ng μL^{-1} de ADN genómico,
- 4.9 % (n=3) en el análisis de diferentes amplicones (empleando mezclas de amplificación distintas) obtenidos a partir de un mismo extracto de avellana (5.0 ng μL^{-1} ADN genómico), o
- 4.2 % (n=6) en el análisis de los amplicones obtenidos a partir de diferentes extractos de avellana (5.0 ng μL^{-1} ADN genómico).

Los valores de RSD obtenidos demuestran la fiabilidad y robustez de los protocolos de extracción, amplificación y cuantificación, y la obtención de una precisión similar en el análisis de la secuencia sintética *Cor a 9* de 50-mer que de amplicones de 100 bp desnaturalizados. Estos resultados demuestran la posibilidad de detectar secuencias de mayor longitud que la secuencia sintética de 50-mer sin comprometer significativamente la eficiencia de los procesos de hibridación y marcaje que implican los genosensores desarrollados.

Con el fin de demostrar la aplicabilidad de la metodología desarrollada para la detección inequívoca de avellana, se evaluó su selectividad comparando las respuestas amperométricas obtenidas con los genosensores desarrollados en el análisis de los amplicones obtenidos (empleando el protocolo de PCR de tiempo reducido puesto a punto), en presencia de 5.0 ng μL^{-1} de ADN genómico extraído de avellana y de otras especies de familias similares (pistacho, anacardo, mandarina y nuez). Los resultados obtenidos se muestran en las Fig. 4.55.

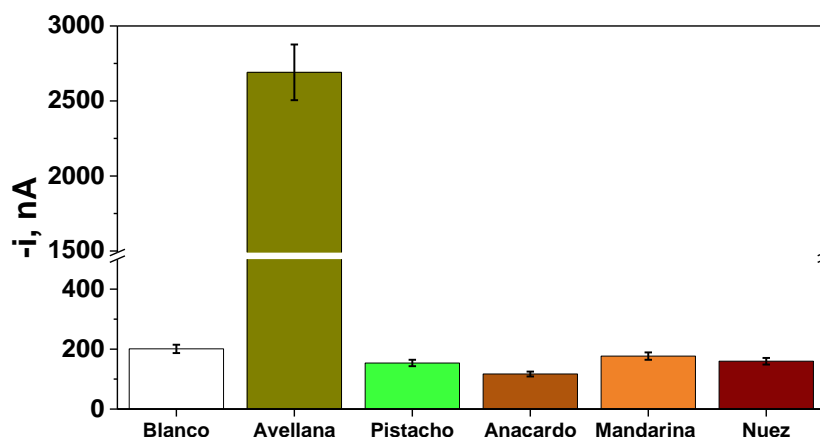


Fig. 4.55: Respuestas amperométricas proporcionadas por los genosensores desarrollados en el análisis de los amplicones (diluidos 50 veces en solución bloqueante de caseína) obtenidos empleando PCR de tiempo reducido en presencia de $5.0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN genómico de avellana, pistacho, anacardo, mandarina y nuez. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Estos resultados (Fig. 4.55) demuestran la obtención de respuestas amperométricas significativamente diferentes a las obtenidas en ausencia de extracto de ADN (Fig. 4.55, barra blanca) únicamente en presencia de ADN genómico de avellana, confirmando la elevada selectividad, tanto de las sondas empleadas para la fabricación del genosensor, como de los cebadores diseñados para la amplificación.

4.3.1.4. Evaluación de la sensibilidad para la determinación de los productos de amplificación

Por último, se evaluó la sensibilidad del acoplamiento PCR de tiempo reducido-genosensor analizando los amplicones obtenidos por PCR de tiempo reducido a partir de distintas concentraciones de ADN genómico de un mismo extracto de avellana. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.56.

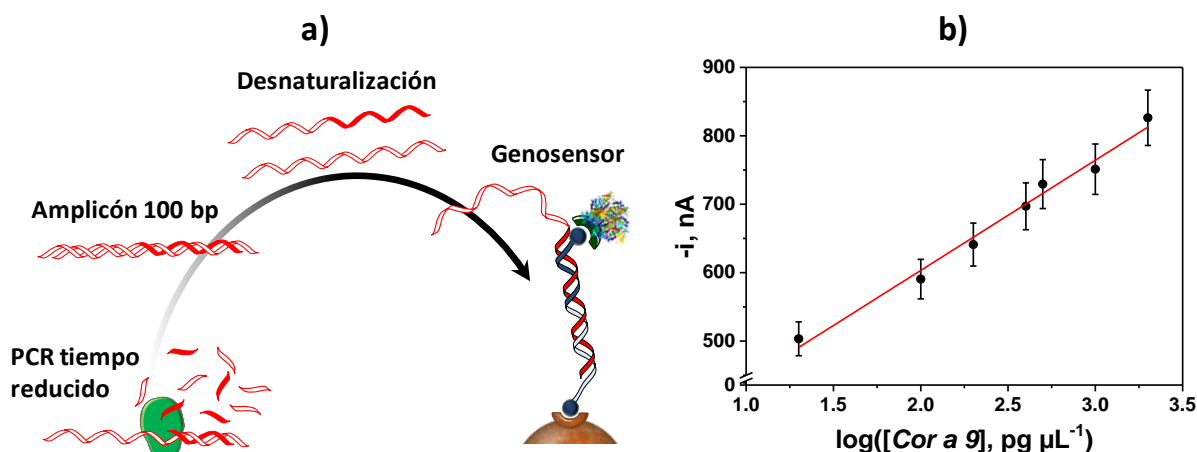


Fig. 4.56: a) Diagrama esquemático del acoplamiento PCR tiempo reducido-genosensor. b) Dependencia de las respuestas amperométricas proporcionadas por el genosensor desarrollado en el análisis de los amplicones (diluidos 50 veces en solución bloqueante de caseína) obtenidos por PCR de tiempo reducido para diferentes cantidades ((20–2000) pg) de ADN genómico de avellana. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos (Fig. 4.56, b) demuestran una dependencia lineal de las respuestas amperométricas obtenidas con el logaritmo de la cantidad de ADN genómico de avellana empleado para la amplificación, en el intervalo comprendido entre 20 y 2000 pg ($r = 0.983$), con una pendiente de (161 ± 9) nA y una ordenada en el origen de (281 ± 22) nA. Estos resultados confirman la posibilidad de detectar tan sólo 20 pg de ADN genómico de avellana por tubo de PCR, lo que equivale a la presencia de 50 genomas de avellana, concentración 100 veces inferior que la que se detecta empleando electroforesis en gel (1000 pg) y del mismo orden que los LDs reportados empleando PCR en tiempo real, de 2.16 [Iniesto, 2013], 9.6 [Andrea, 2011] y 100 pg [Arlorio, 2007] para *Cor a 9*, *Cor a 8* y *Cor a 1.02*, respectivamente.

El empleo de genosensores electroquímicos acoplados a estrategias de amplificación para la detección de avellana ha sido descrito únicamente en la detección de los isotipos del gen *Cor a 1* [Bettazzi, 2008], [Berti, 2009]. Las metodologías propuestas se basan también en un formato de hibridación tipo sándwich sobre electrodos serigrafiados de oro, empleando AP para el marcaje enzimático de los híbridos y DPV para la detección electroquímica. Es importante destacar que el genosensor desarrollado en esta Tesis Doctoral permite la obtención de LDs 139–278 veces inferiores para la determinación de secuencias sintéticas (0.72 pM vs. 0.1 nM [Bettazzi, 2008] o 0.2 nM [Berti, 2009]) y en un tiempo de análisis más de cuatro veces

inferior. Debe resaltarse, además, la sencillez del protocolo de fabricación de los genocaptadores magnéticos, de tan sólo 15 minutos, en comparación con las 16.5 h necesarias para la modificación de superficies de oro con secuencias tioladas [Bettazzi, 2008]. Estas mejoras significativas de la sensibilidad, junto a la simplificación y reducción de los tiempos de fabricación y análisis, demuestran el potencial práctico de la metodología desarrollada para la identificación de la presencia de avellana en productos alimentarios potencialmente contaminados o adulterados intencionadamente con avellana.

Es importante mencionar también, que el desarrollo de plataformas genosensoras para la identificación de alérgenos a nivel genético resulta de gran interés para complementar los análisis de proteínas alergénicas, fundamentalmente en matrices alimentarias procesadas, donde la desnaturalización de estas proteínas dificulta en gran medida su detección [Arlorio, 2007], [Bettazzi, 2008]. Además, la versatilidad demostrada por las plataformas biosensoras desarrolladas en esta Tesis Doctoral, basadas en el empleo de MBs, permitiría el desarrollo de plataformas de multiplexado para la identificación de alérgenos a cualquier nivel molecular en alimentos procesados o sin procesar.

4.3.2. Desarrollo y comparación de plataformas biosensoras con prestaciones analíticas mejoradas para la determinación de ácidos nucleicos

En este apartado se discuten los resultados más relevantes del artículo: *Ruiz-Valdepeñas Montiel et al. Comparison of different strategies for the development of highly sensitive electrochemical nucleic acid biosensors using neither nanomaterials nor nucleic acid amplification. ACS Sens. 3 (2018) 211–221*, aportado como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

El objetivo de la investigación que se discute en este apartado, es la comparación de diferentes formatos de ensayo y novedosas estrategias de marcaje enzimático para la implementación de biosensores electroquímicos que permitan la determinación sensible

de ácidos nucleicos, sin necesidad de recurrir al empleo de estrategias convencionales de amplificación de ácidos nucleicos o basadas en el empleo de nanomateriales.

En la actualidad, las metodologías convencionales empleadas en la detección rutinaria de secuencias de ácidos nucleicos con genosensores electroquímicos, están basadas en el empleo de formatos de hibridación tipo sándwich que involucran la captura y detección de la secuencia de interés empleando sondas sintéticas complementarias de ácidos nucleicos. Resulta destacable en este campo, la ausencia de estudios sistemáticos que permitan conocer, tanto la influencia de las variables fundamentales involucradas en su fabricación, como el desarrollo de estrategias que permitan personalizar “a demanda” las prestaciones analíticas de estas metodologías para cada aplicación en particular.

Con este propósito, se ha realizado una comparación sistemática de la influencia de algunas variables experimentales más determinantes en la fabricación de genosensores electroquímicos y que incluyen: el formato de bioensayo, el empleo de anticuerpos comerciales selectivos a heterohíbridos de ADN/ARN como elementos de captura o de detección de los mismos, la longitud de los homo- o hetero- híbridos formados y las estrategias empleadas para el marcaje enzimático y/o amplificación de las respuestas electroquímicas empleando receptores de afinidad comerciales conjugados a distinto número de unidades de enzima.

Los distintos formatos de bioensayo evaluados para la detección de una misma secuencia sintética de ADN de 48-mer (fragmento de la región *D-loop* del ADN mitocondrial del caballo), basados en el empleo de MBs como μ -soportes sólidos para su edificación y SPCEs para la transducción amperométrica, se muestran de forma esquemática en la Fig. 4.57. Los bioensayos evaluados incluyen: formatos de hibridación de tipo competitivo, en los que la secuencia de interés compite con una sonda sintética idéntica modificada con FITC, por su hibridación con la sonda de captura complementaria; formatos de hibridación tipo sándwich; el empleo de una estrategia de amplificación del híbrido de interés de forma concatenada con secuencias sintéticas lineales modificadas con el fluoróforo FITC, y el empleo de estrategias basadas en el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente heterohíbridos de ADN/ARN ($Ab_{ADN/ARN}$), como bioreceptor de captura, inmovilizado de forma orientada sobre MBs funcionalizadas con proteína G (ProtG-MBs) o de detección, tras su marcaje enzimático con un anticuerpo secundario conjugado con HRP (anti-IgG-HRP) o con una

proteína bacteriana (Proteína A, ProtA, de *Staphylococcus aureus*) conjugada con una molécula de HRP (ProtA-HRP) o con un homopolímero que contiene 40 moléculas de HRP (ProtA-poli-HRP40).

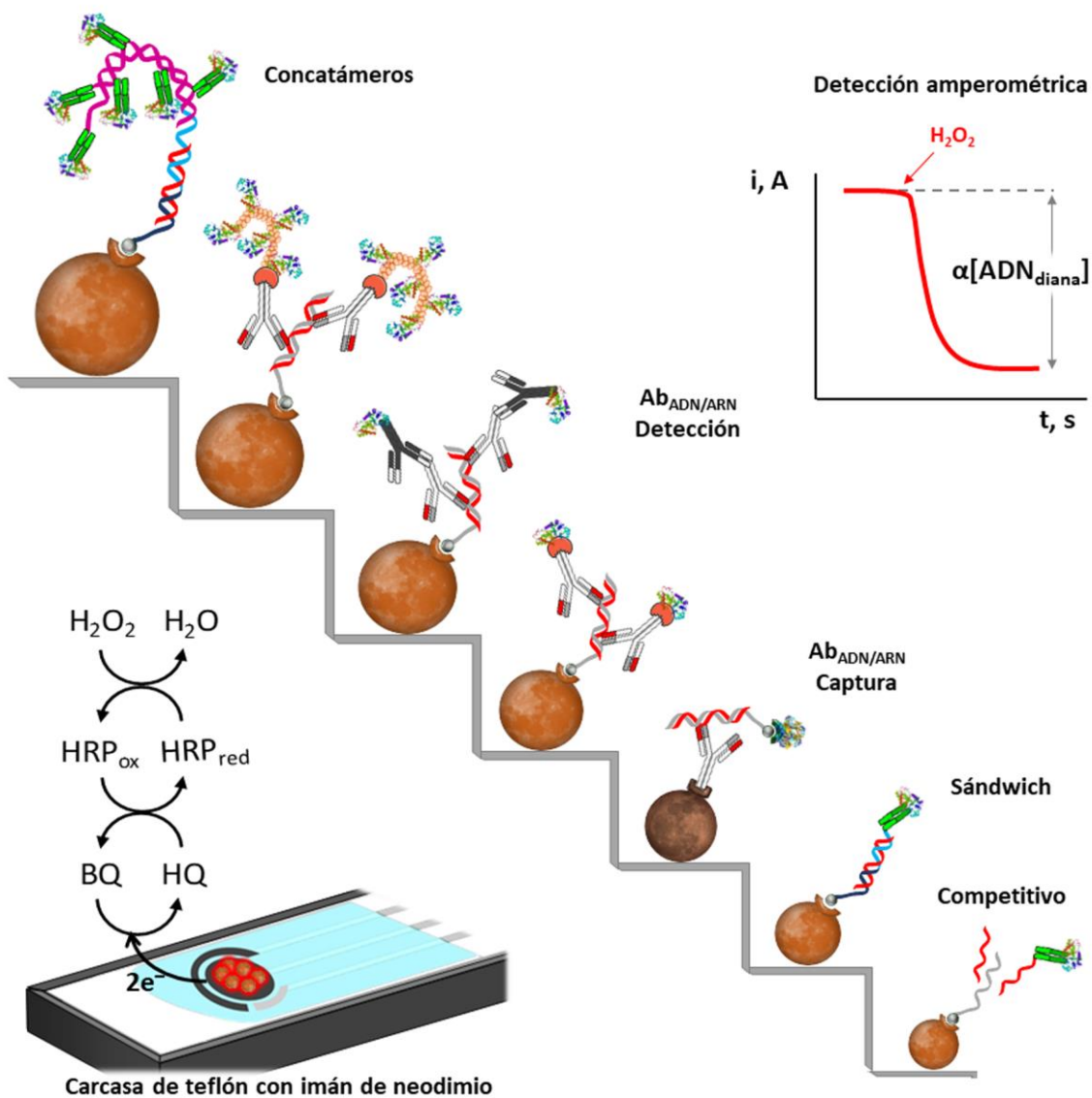


Fig. 4.57: Diagrama esquemático de los formatos de bioensayo evaluados para la detección de una misma secuencia sintética de ADN de 48-mer basados en el empleo de MBs y SPCEs. Conjunto biosensor-SPCE-carcasa con imán de neodimio y reacciones enzimáticas implicadas en la detección amperométrica de la reducción enzimática del H_2O_2 mediada por HQ .

4.3.2.1. Optimización de variables experimentales

En este apartado se van a comparar un total de 11 plataformas biosensoras para la detección de una misma secuencia sintética de ADN de 48-mer. En este punto cabe destacar, que 6 de estas plataformas, basadas en el empleo del $\text{Ab}_{\text{ADN/ARN}}$, se han optimizado, implementado y comparado por primera vez en nuestro grupo de investigación. Las 5 plataformas biosensoras restantes, basadas en formatos de hibridación de homo- o heterohíbridos de ADN, empleando formatos de tipo competitivo o sándwich o estrategias de amplificación del híbrido de forma artificial y concatenada con secuencias sintéticas lineales de ADN modificadas con biotina en uno de sus extremos (concatámeros), aunque ya se han descrito previamente en la literatura, se han trasladado y optimizado en este trabajo para la determinación de la secuencia diana de interés.

Con el fin de facilitar su comparación a lo largo de este apartado, en la Fig. 4.58 se asigna una numeración a cada una de ellas y se muestra un diagrama esquemático indicando bioreactivos, nomenclatura, formato de ensayo, tamaño del homo- o heterohíbrido formado y marcaje enzimático empleado.

En la Tabla 4.22 se recogen los valores seleccionados como óptimos para cada plataforma biosensora, optimizados en este trabajo o en el Grupo de Investigación, tomando como criterio de selección la mejor relación (S/B) de las respuestas amperométricas que proporcionan los biosensores en ausencia (B) o presencia (S) de la secuencia sintética diana de 48-mer. Otras variables involucradas en el proceso de detección amperométrica, como las concentraciones de H_2O_2 e HQ y el potencial a aplicar (-0.20 V vs. electrodo de referencia de Ag/AgCl), se optimizaron en trabajos anteriores realizados en el Grupo de Investigación [Conzuelo, 2012-a], [Eguílaz, 2010], [Gamella, 2012].

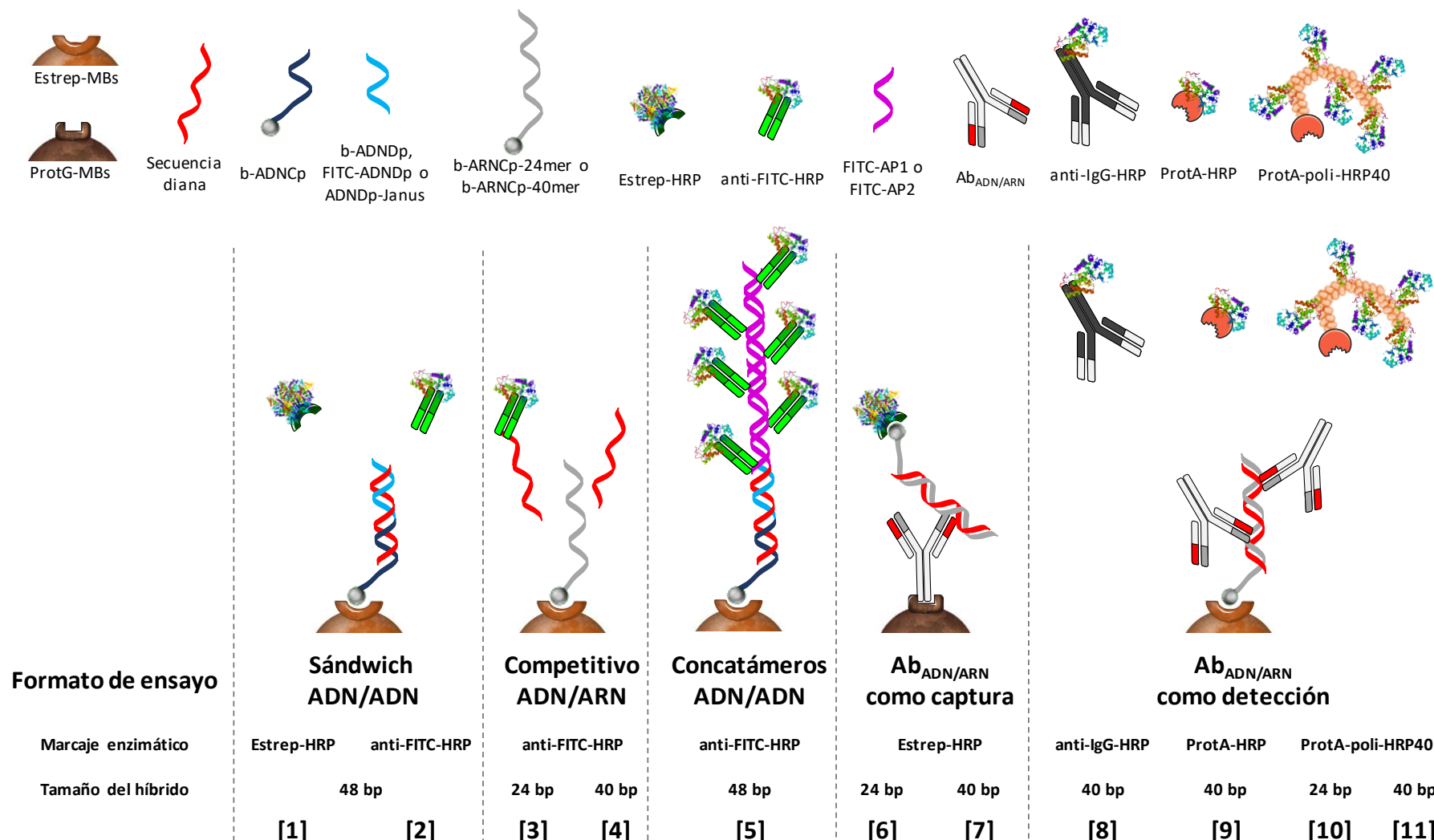


Fig. 4.58: Diagrama esquemático, numeración asignada ([X]) y fundamentos básicos (formato de ensayo, marcaje enzimático y tamaño del híbrido capturado) de las 11 plataformas biosensoras desarrolladas para la determinación de una secuencia de ADN de 48-mer.

Tabla 4.22. Variables experimentales seleccionadas como óptimas para la fabricación de las plataformas biosensoras desarrolladas para la detección de la misma secuencia sintética de 48-mer para cada formato de ensayo evaluado. [X]: indica la plataforma biosensora de acuerdo con la numeración asignada que se muestra en la Fig. 4.58.

* [Torrente-Rodríguez, 2016-a].

Formato	Biocaptore magnéticos	Análisis de la secuencia diana de 48-mer		
Competitivo	Estrep-MBs: 0.5 μ L b-ARNCp (24 [3] o 40 [4]-mer): 0.0025 μ M t_{inc} : 15 min	FITC-Target: 0.0025 μ M anti-FITC-HRP: dil. 1/500 t_{inc} : 120 min		
Sándwich	Estrep-MBs: 5.0 μ L b-ADNCp (24-mer): 0.1 μ M t_{inc} : 30 min	b-ADNDp (24-mer): 0.25 μ M t_{inc} : 30 min [1]	Estrep-HRP: dil. 1/1000 t_{inc} : 30 min [1]	
		FITC-ADNDp (24-mer): 0.25 μ M t_{inc} : 30 min [2]	anti-FITC-HRP: dil. 1/5000 t_{inc} : 30 min [2]	
Concatámeros [5]	Estrep-MBs: 5.0 μ L b-ADNCp (24-mer): 0.1 μ M t_{inc} : 30 min	DNADp-Janus: 0.05 μ M FITC-AP1, FITC-AP2: 0.1 μ M t_{inc} : 30 min	b-ADNCp-MBs t_{inc} : 15 min	anti-FITC-HRP: dil. 1/5000 t_{inc} : 15 min
Ab _{ADN/ARN} como detección	Estrep-MBs: 5.0 μ L b-ARNCp (24 [10] o 40 [8] [9] [11]-mer): 0.1 μ M t_{inc} : 60 min	b-ARNCp-MBs t_{inc} : 30 min	Ab _{ADN/ARN} : 2.0 μ g mL ⁻¹ anti-IgG-HRP: 0.4 μ g mL ⁻¹ t_{inc} : 30 min [8]	
			Ab _{ADN/ARN} : 2.0 μ g mL ⁻¹ ProtA-HRP: 1.0 μ g mL ⁻¹ t_{inc} : 30 min [9]	
			Ab _{ADN/ARN} : 2.0 μ g mL ⁻¹ ProtA-poli-HRP40: 1.0 μ g mL ⁻¹ t_{inc} : 30 min [10] [11]	
*Ab _{ADN/ARN} como captura	ProtG-MBs: 2.5 μ L Ab _{ADN/ARN} : 2.0 μ g mL ⁻¹ t_{inc} : 45 min	b-ARNCp (24 [6] o 40 [7]-mer): 0.05 μ M t_{inc} : 45 min	Ab _{ADN/ARN} -MBs t_{inc} : 45 min	Estrep-HRP: dil. 1/25000 t_{inc} : 30 min

Las características particulares de cada plataforma desarrollada se comentarán a lo largo de este apartado.

Los valores óptimos mostrados en la Tabla 4.22 demuestran diferencias significativas en la fabricación de genocaptorees magnéticos para formatos de hibridación competitivos, en comparación con el resto de formatos evaluados. Por ello, se describen y discuten, brevemente a continuación, los resultados obtenidos en las optimizaciones de la cantidad de Estrep-MBs y de la concentración de sondas sintéticas biotiniladas (b-Cp) empleadas en la fabricación de genocaptorees para ensayos de hibridación tipo competitivo o sándwich ([4] y [2], respectivamente, seleccionados por emplear el mismo marcaje enzimático con anti-FITC-HRP e híbridos del mismo tamaño).

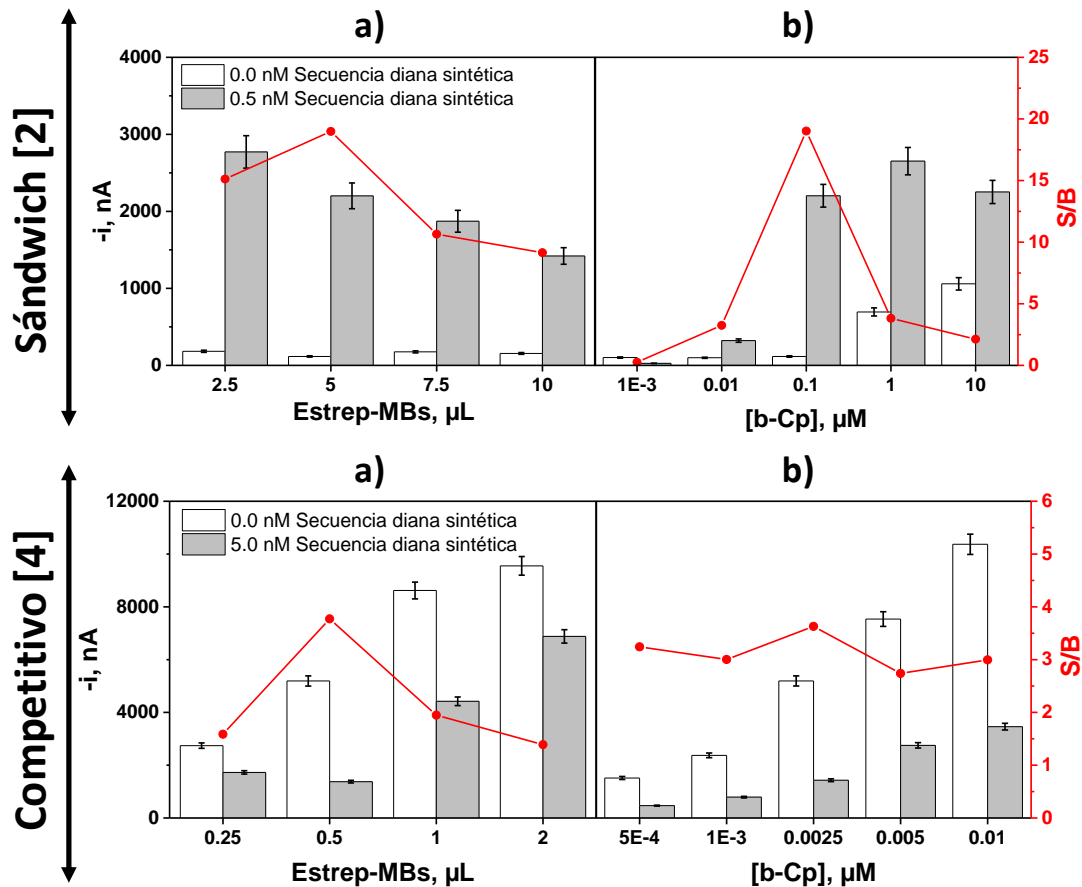


Fig. 4.59: Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores preparados en ausencia (B) y en presencia de 0.5 [2] o 5.0 [4] nM de la secuencia sintética de ADN diana de 48-mer (S), así como la relaciones S/B resultantes, con el volumen de Estrep-MBs a) y la concentración de b-Cp inmovilizada b) para los formatos de ensayos evaluados. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados obtenidos demuestran, para el formato de hibridación tipo sándwich (Fig. 4.59, [2] b), un aumento de las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de la secuencia diana y de la relación S/B con la concentración de b-Cp inmovilizada, hasta 0.1 μM , y una disminución significativa de la relación S/B para concentraciones superiores. Esta disminución en la relación S/B puede atribuirse, tanto al aumento de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de la secuencia sintética diana, como a la disminución de la eficiencia de hibridación cuando se inmovilizan grandes cantidades de la b-Cp sobre las MBs [Liu, 2014], [Zouari, 2017]. Los resultados obtenidos para el formato competitivo (Fig. 4.59, [4] b) demostraron la obtención de una concentración óptima de b-Cp 40 veces inferior, en comparación con la que resulta más ventajosa para el formato tipo sándwich ((0.0025 vs. 0.1) μM , respectivamente). Estos resultados pueden justificarse por la necesidad de una elevada

carga de b-Cp sobre las MBs en formatos de hibridación tipo sándwich, con el fin de capturar la mayor cantidad posible de la secuencia diana, y su transducción sobre la superficie electrónica, observándose la misma tendencia en otros formatos que emplean concatámeros [5] o el Ab_{ADN/ARN} como bioelemento de detección [8–11]. Por el contrario, en un ensayo competitivo, la necesidad de competición entre la secuencia diana y la secuencia sintética idéntica modificada con FITC por la unión con la b-Cp, hace que un exceso inmovilizado de ésta sobre las MBs se traduzca en una menor competición y por tanto en una disminución de la sensibilidad del ensayo [Wang, 2015].

Estos resultados son concordantes con los obtenidos en la optimización de la cantidad de Estrep-MBs (Fig. 4.59 a), que demostraron la necesidad de emplear cantidades 10 veces superiores en la fabricación de genocaptadores basados en formatos de hibridación tipo sándwich en comparación con las que resultan óptimas para formatos competitivos ((5.0 vs. 0.5) μ L, respectivamente).

4.3.2.2. Características analíticas y operacionales

Trabajando en las condiciones experimentales optimizadas, se caracterizó el comportamiento analítico de las 11 plataformas biosensoras desarrolladas para la determinación individual de estándares de la secuencia diana sintética de 48-mer (preparados en solución bloqueante de caseína). Las características analíticas obtenidas se resumen en la Tabla 4.23.

Tabla 4.23. Características analíticas obtenidas para la determinación de estándares de la secuencia sintética de ADN diana con todas las plataformas biosensoras desarrolladas y factor de amplificación resultante (en fuente roja) tras la comparación de las pendientes que proporcionan en comparación con el formato convencional tipo sándwich [1].

Formato de ensayo	Sándwich ADN/ADN		Competitivo ADN/ARN		Concatámeros	Ab _{ADN/ARN} como captura		Ab _{ADN/ARN} como detección			
Marcaje enzimático	Estrep-HRP	anti-FITC-HRP	anti-FITC-HRP		anti-FITC-HRP	Estrep-HRP		anti-IgG-HRP	ProtA-HRP	ProtA-poli-HRP40	
Tamaño del híbrido	48 bp		24 bp	40 bp	48 bp	24 bp	40 bp	40 bp	40 bp	24 bp	40 bp
Numeración asignada (Fig 4.58)	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]
r ²	0.9992	0.9991	0.9935	0.9968	0.9987	0.9997	0.9991	0.9983	0.9992	0.9987	0.998
Pendiente, nA nM ⁻¹	(119.0 ± 1.3)	(4155 ± 31)	(-394 ± 8)	(-747 ± 11)	(33522 ± 432)	(6752 ± 32)	(9448 ± 83)	(23529 ± 78)	(9986 ± 80)	(40629 ± 297)	(91796 ± 728)
Ordenada en el origen, nA	(86 ± 27)	(117 ± 13)	(3101 ± 20)	(5099 ± 27)	(31 ± 18)	(72 ± 4)	(214 ± 10)	(58 ± 13)	(51 ± 4)	(206 ± 25)	(244 ± 20)
Factor de amplificación vs. convencional [1]	–	35	3.3	6.3	282	57	79	198	84	341	771
I.L, pM	812–50000	16–1000	1475–5000	1041–5000	1.2–100	9.0–250	7.3–250	1.2–100	2.5–100	1.4–250	0.39–75
LD, pM	157	4.8	442	312	0.3	2.7	2.2	0.4	0.8	0.4	0.12
RSD _(n=8) (secuencia diana, pM)	4.7 (25000)	7.5 (250)	6.6 (3000)	3.7 (3000)	6.0 (50)	6.4 (100)	4.8 (100)	4.8 (10)	2.2 (50)	3.7 (100)	4.0 (5)
Tiempo de análisis, min	60	60	120	120	60	120	120	60	60	60	60

Los LD y LC se estimaron con los criterios $3 \times s_b/m$ y $10 \times s_b/m$, respectivamente, a partir de los valores de la desviación estándar de 10 señales amperométricas obtenidas en ausencia de la secuencia diana y de las pendientes de los calibrados que se muestran en la Tabla 4.23.

La reproducibilidad de las plataformas desarrolladas se evaluó comparando las respuestas amperométricas proporcionadas por biosensores diferentes preparados de la misma manera, para estándares de la secuencia diana en las concentraciones indicadas en la Tabla 4.23, obteniéndose valores de RSD comprendidos entre 2.2 y 7.5 %. Estos resultados confirman la buena reproducibilidad de fabricación y transducción de todas las bioplataformas desarrolladas.

A continuación, se compararán las diferentes variables involucradas en la fabricación de las plataformas amperométricas desarrolladas, discutiendo su influencia en las características analíticas resumidas en la Tabla 4.23.

4.3.2.3. Influencia del formato de bioensayo

En primer lugar, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y presencia de estándares de 100 pM de la secuencia sintética diana empleando diferentes formatos de bioensayo, entre los que no se incluyen las estrategias de amplificación basadas en el empleo de concatámeros o proteínas bacterianas conjugadas con múltiples moléculas de HRP (ProtA-poli-HRP40). Los resultados obtenidos para todos los formatos evaluados en el análisis de híbridos del mismo tamaño y empleando el mismo marcaje enzimático (anti-FITC-HRP, para [2] y [4]) se muestran en la Fig. 4.60.

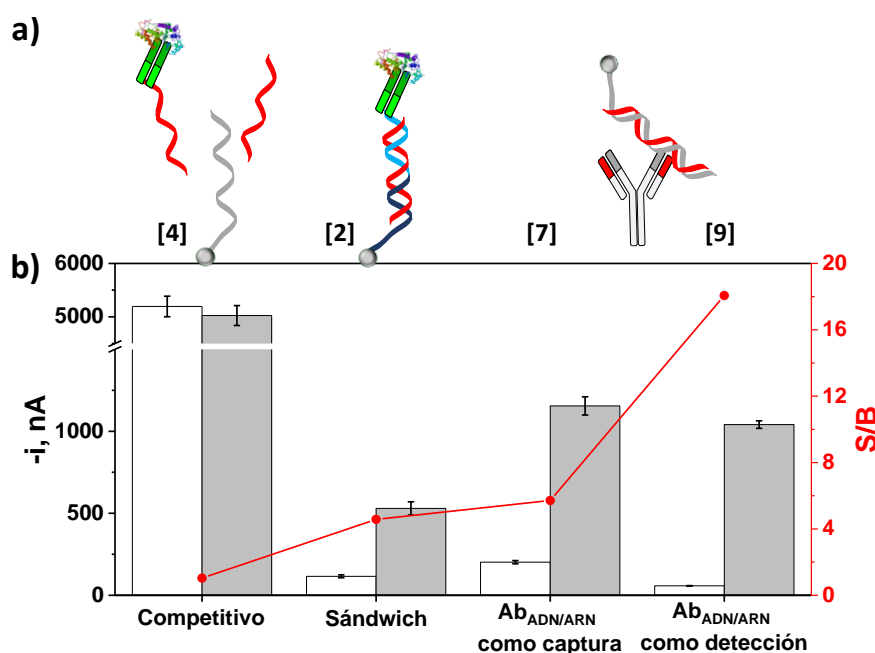


Fig. 4.60: a) Diagrama esquemático y b) respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y en presencia de estándares de 100 pM de la secuencia de ADN sintética diana de 48-mer (S, barras grises), así como las relaciones S/B resultantes (línea roja), para los formatos de ensayo tipo competitivo [4] o sándwich [2] o basados en el empleo del Ab_{ADN/ARN} como bioelemento de captura [7] o de detección [9]. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados mostrados en la Fig. 4.60 y resumidos en la Tabla 4.23, demuestran que los formatos de hibridación competitivos no permiten la detección de 100 pM de la secuencia sintética diana (LDs = 442 [3]–312 pM [4]) y proporcionan una sensibilidad 5 veces inferior a la obtenida empleando formatos de hibridación tipo sándwich (valores de pendiente de 747 [4] vs. 4155 nA nM⁻¹ [2], respectivamente).

Los resultados obtenidos demuestran, claramente, que las mejores relaciones S/B se obtienen para los ensayos basados en el empleo del Ab_{ADN/ARN}, debido a la elevada afinidad de este anticuerpo por heterohíbridos de ADN/ARN [Tran, 2013], [Torrente-Rodríguez, 2016-a]. Resulta destacable, además, que se obtienen sensibilidades similares tanto cuando el Ab_{ADN/ARN} se emplea como bioelemento de captura, inmovilizado sobre MBs funcionalizadas con proteína G, como cuando se emplea de detección, marcándose enzimáticamente, en este caso, con ProtA-HRP (valores de pendientes de 9448 [7] y 9986 [9] nA nM⁻¹, respectivamente). Estos resultados confirman la versatilidad que ofrece este anticuerpo comercial (Ab_{ADN/ARN}) para la implementación de plataformas biosensoras electroquímicas que permitan la determinación sensible de ácidos nucleicos.

4.3.2.4. Influencia del tamaño del híbrido formado

Teniendo en cuenta que la longitud del híbrido formado entre la secuencia diana y las sondas sintéticas de captura y/o detección, empleadas en la fabricación de biosensores, resulta de gran importancia en la eficiencia de la hibridación, afectando directamente a la sensibilidad de las plataformas genosensoras [Lubin, 2009], [Liu, 2007], se evaluó la influencia de esta variable en los diferentes formatos desarrollados. Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas para la detección de los heterohíbridos formados entre la secuencia diana de 48-mer y sondas de ARN de captura (biotiniladas) y/o de detección de 24 y 40-mer.

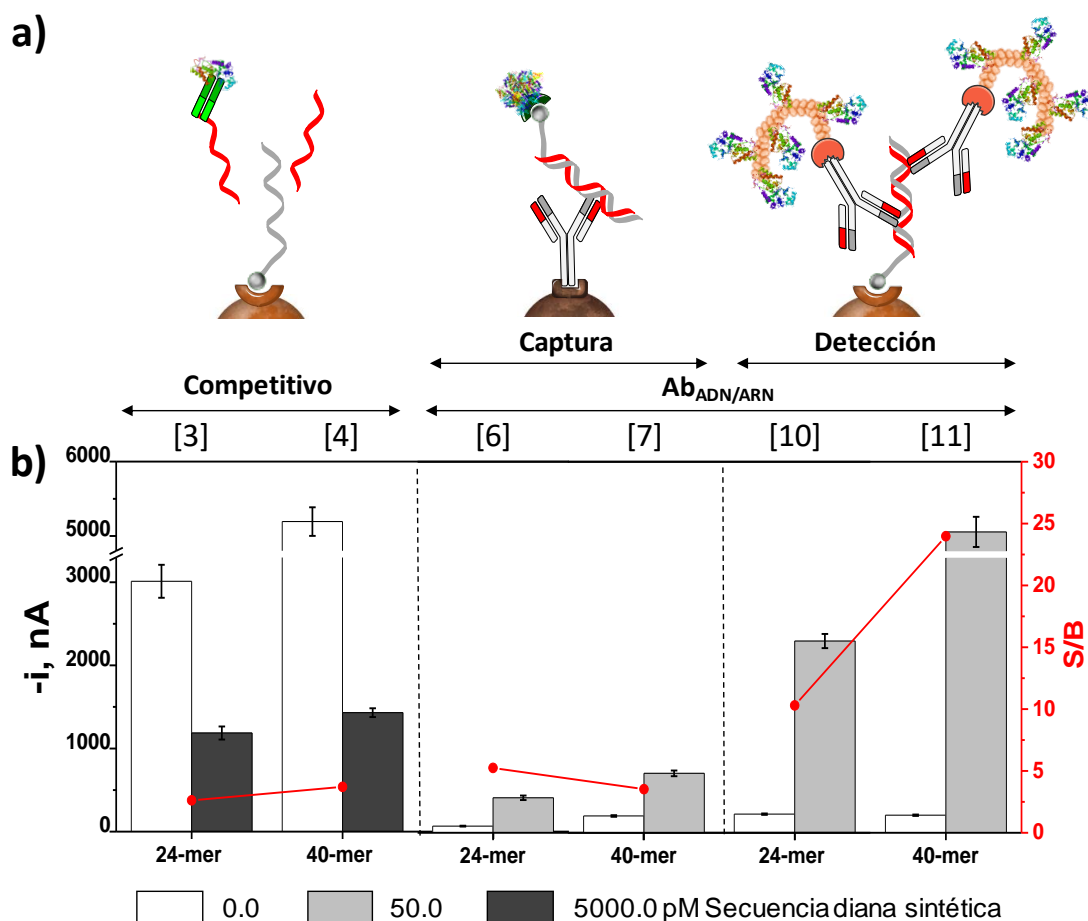


Fig. 4.61: Influencia de la longitud de los heterohíbridos de ADN/ARN formados en los diferentes formatos evaluados sobre las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y en presencia de 50.0 [6, 7, 10 y 11] (barras grises claro) o 5000.0 pM [3 y 4] (barras grises oscuro) de la secuencia sintética de ADN diana de 48-mer (S), así como la relaciones S/B resultantes (líneas rojas).

Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Como se observa en la Fig. 4.61, el tamaño del heterohíbrido formado tiene una influencia drástica en el formato que emplea el Ab_{ADN/ARN} como bioelemento de detección. Los resultados obtenidos demuestran relaciones S/B del mismo orden o superiores para heterohíbridos de 40 bp para todos los formatos ensayados, excepto para el formato basado en el empleo del Ab_{ADN/ARN} como bioelemento de captura, debido a las respuestas amperométricas ligeramente superiores obtenidas en ausencia de secuencia sintética de ADN diana, y por lo tanto, relaciones S/B ligeramente inferiores para heterohíbridos más largos.

Una comparación más exhaustiva de la influencia de la longitud de los heterohíbridos formados, a partir de las características analíticas resumidas en la Tabla 4.23, permite concluir que se han obtenido sensibilidades 1.9, 1.4 y 2.3 veces mayores empleando heterohíbridos de 40 vs. 24 bp para los formatos de ensayos competitivos (747 [4] vs. 394 nA nM⁻¹ [3]), o basado en el empleo del Ab_{ADN/ARN} como bioelemento de captura (9448 [7] vs. 6752 nA nM⁻¹ [6]) o de detección (91796 [11] vs. 40629 nA nM⁻¹ [10]), respectivamente, y LDs 1.4 (312 [4] vs. 442 pM [3]), 1.2 (2.2 [7] vs. 2.7 pM [6]) y 3.3 veces inferiores (0.12 [11] vs. 0.4 pM [10]), respectivamente. Estos resultados confirman, tanto la termodinámica más favorable que se produce entre híbridos de mayor longitud [Lubin, 2009], como la influencia mucho más significativa de esta variable en el formato que emplea el Ab_{ADN/ARN} como bioelemento de detección. Este efecto sólo puede justificarse por un mayor número de anticuerpos inmovilizados en los heterohíbridos de mayor longitud, lo que conlleva a una mayor amplificación de la señal, en concordancia con los resultados descritos por Qavi y col., que establecen que el anticuerpo empleado reconoce un epítipo de aproximadamente 6 pares de bases en los heterohíbridos de ADN/ARN [Qavi, 2011]. De acuerdo con estas evidencias, teóricamente habría 2 anticuerpos más inmovilizados por híbrido de 40 bp que de 24 bp.

Con el fin de confirmar estos resultados, y aprovechando los reactivos disponibles en el Grupo de Investigación, se evaluó la sensibilidad para la detección de heterohíbridos de diferente longitud, empleando el Ab_{ADN/ARN} como bioelemento de detección.

Para ello, se llevó a cabo la formación de heterohíbridos biotinilados de distinta longitud en disolución, su captura sobre la superficie de las Estrep-MBs y su posterior reconocimiento y marcaje enzimático con la mezcla (Ab_{ADN/ARN} y ProtA-poli-HRP40). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.62.

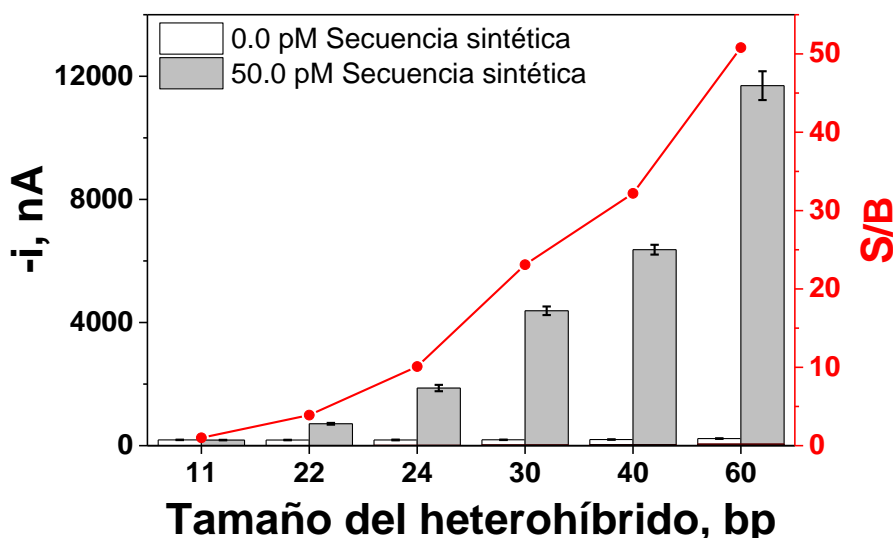


Fig. 4.62: Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y en presencia de los heterohíbridos de diferente longitud formados con 50.0 pM de la secuencia sintéticas dianas (S, barras grises) así como la relaciones S/B resultantes (línea roja). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados mostrados en la Fig. 4.62 confirman el incremento drástico de la relación S/B, y por lo tanto la sensibilidad de la metodología, con el tamaño del heterohíbrido formado por el aumento del número de anticuerpos inmovilizados por cada heterohíbrido.

Estos resultados, junto con la disponibilidad comercial de conjugados con polímeros que contienen distinta carga de moléculas de enzima (ProtA-poli-HRP 20, 40 u 80), ponen de manifiesto el potencial de la metodología desarrollada, basada en el empleo del Ab_{ADN/ARN} como bioelemento de detección, para la determinación de ácidos nucleicos independientemente de su variedad natural (ADN o ARN) y pudiendo modular a voluntad la sensibilidad en función de los requerimientos particulares de cada aplicación.

4.3.2.5. Evaluación del marcaje enzimático

En primer lugar, se evaluó la posibilidad de mejorar la sensibilidad variando únicamente la modificación con la que se adquieren las secuencias sintéticas de detección empleadas en la fabricación de genosensores basados en formatos de

hibridación tipo sándwich. Para ello, se comparó el marcaje convencional de secuencias modificadas con biotina y marcadas con Estrep-HRP, con el de secuencias modificadas con FITC marcadas con fragmentos Fab de un anticuerpo para FITC conjugados con peroxidasa (anti-FITC-HRP). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.63.

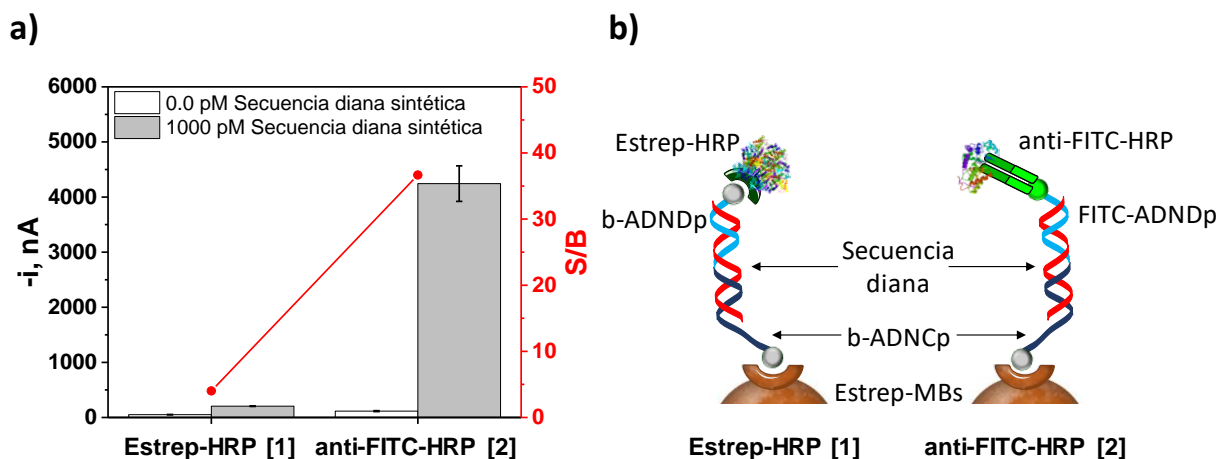


Fig. 4.63: a) Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y en presencia de 1000.0 pM de la secuencia sintética de ADN diana (S, barras grises), así como las relaciones S/B resultantes (línea roja), para los formatos de hibridación tipo sándwich empleando sondas de detección biotiniladas y Estrep-HRP [1] o sondas de detección marcadas con FITC y anti-FITC-HRP [2] para el marcaje enzimático de los mismos y b) diagramas esquemáticos de cada biosensor empleado. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Estos resultados (Fig. 4.63) demuestran la obtención de una relación S/B significativamente superior cuando se emplean sondas de detección marcadas con FITC y anti-FITC-HRP. De acuerdo con nuestros resultados, el marcaje FITC/anti-FITC-HRP proporciona sensibilidades 35 veces superiores a las obtenidas empleado el formato convencional (biotina/Estrep-HRP) (4155 [2] vs. 119 nA nM^{-1} [1]) y LDs 33 veces inferiores (4.8 [2] vs. 157 pM [1]) (Tabla 4.23). Estos resultados pueden justificarse por la mayor afinidad del fragmento de anticuerpo empleado para el reconocimiento del FITC en comparación con la interacción biotina-estreptavidina y por la multivalencia de la estreptavidina, que puede causar el reconocimiento de varias sondas de detección biotiniladas, lo que conllevaría a un menor número de moléculas de HRP por cada secuencia de ADN diana capturada sobre las MBs y, por tanto, a una disminución de la sensibilidad del ensayo [Miranda-Castro, 2018], [González-Álvarez, 2013], [Delaive, 2008].

Teniendo en cuenta la mejora significativa de sensibilidad que proporciona el empleo del $Ab_{ADN/ARN}$ para el reconocimiento de heterohíbridos cuando se emplea como bioelemento de detección, se evaluó la posibilidad de marcarlo enzimáticamente, por la región Fc, con otras biomoléculas disponibles comercialmente: anticuerpos secundarios o proteínas bacterianas conjugadas con una molécula de HRP o con homopolímeros que contienen múltiples moléculas de esta enzima.

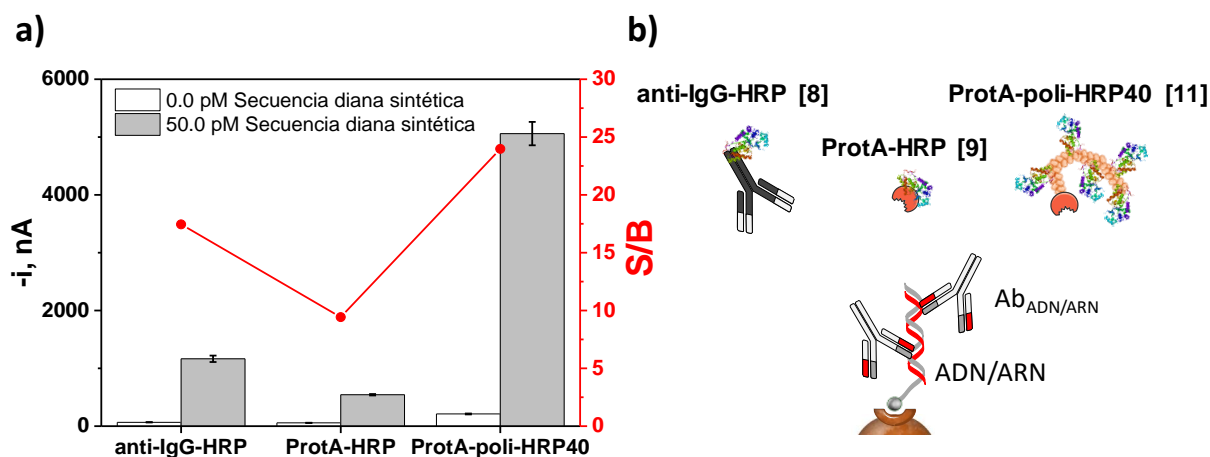


Fig. 4.64: a) Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y en presencia de 50.0 pM de la secuencia sintética de ADN diana (S, barras grises), así como las relaciones S/B resultantes (línea roja), con biosensores basados en el empleo de $Ab_{ADN/ARN}$ como bioelemento de detección y en su marcaje enzimático con anti-IgG-HRP [8], ProtA-HRP [9] o ProtA-poli-HRP40 [11] y b) diagramas esquemáticos de cada biosensor empleado. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados mostrados en la Fig. 4.64 demostraron, como era de esperar, la mayor relación S/B cuando se empleaba la ProtA-poli-HRP40, debido al factor de amplificación que supone el reconocimiento de cada $Ab_{ADN/ARN}$ por una molécula de proteína A conjugada con múltiples moléculas del marcador enzimático (HRP). La comparación de los resultados obtenidos empleando biomoléculas conjugadas con una única molécula de HRP demostró una sensibilidad 2.4 veces superior cuando se empleaba el anticuerpo secundario (anti-IgG-HRP) en comparación con la proteína bacteriana (ProtA-HRP) (23529 [8] vs. 9986 nA nM⁻¹ [9]). Esta mayor sensibilidad puede ser atribuida, de nuevo, a la mayor afinidad en el reconocimiento de la región Fc del $Ab_{ADN/ARN}$ empleando anticuerpos secundarios en comparación con la proteína A y

al mayor número de anticuerpos secundarios que pueden unirse a diferentes epítomos del Ab_{ADN/ARN} [Owen, 2010].

La evaluación de la estrategia de amplificación basada en el empleo de bioconjugados con múltiples moléculas de HRP, se llevó a cabo comparando los resultados obtenidos para el reconocimiento selectivo del Ab_{ADN/ARN} empleando la misma biomolécula (ProtA), pero conjugada con una molécula de HRP o con un polímero que contiene 40 HRPs. Los resultados obtenidos demuestran un factor de amplificación de 9.2 con el reactivo multienzimático (9986 [9] vs. 91796 nA nM⁻¹ [11]). Sin embargo, es importante señalar que este factor de amplificación es inferior a lo esperado (~40, considerando el número de HRP por cada molécula de protA), aspecto que se discutirá en el apartado 4.3.2.6.

Los resultados discutidos hasta el momento en este capítulo, ponen de manifiesto la posibilidad de diseñar novedosas estrategias de amplificación en plataformas biosensoras basadas en formatos tipo sándwich, empleando fragmentos de anticuerpo secundarios o proteínas bacterianas conjugadas con polímeros que contienen múltiples unidades de enzima, disponibles comercialmente, para el marcaje de los anticuerpos de detección. Es importante destacar, además, que aunque hasta la fecha estas estrategias se han explorado fundamentalmente para la implementación de plataformas inmunosensoras [Munge, 2005], [Mani, 2009], [Chikkaveeraiah, 2012], estos resultados confirman también su aplicabilidad para el desarrollo de biosensores con sensibilidad mejorada para la determinación de ácidos nucleicos.

4.3.2.6. Estrategias de amplificación

Por último, se evaluó la posibilidad de acoplar los biosensores desarrollados a otras estrategias de amplificación fácilmente implementables en dispositivos en el punto de atención, basadas en el empleo de concatámeros de ADN, que permiten alargar artificialmente la longitud de híbridos de ADN, incorporando en los mismos múltiples zonas de unión para el marcador enzimático.

A continuación, se va a llevar a cabo una comparación exhaustiva de la estrategia de amplificación basada en el empleo de la ProtA-poli-HRP40 con una estrategia de

amplificación basada en el empleo de concatámeros de ADN. Esta estrategia consiste en un alargamiento artificial de la longitud del híbrido formado de forma concatenada, con secuencias sintéticas de ADN lineales modificadas con FITC capaces de generar un híbrido que incorpora múltiples moléculas de FITC y en el empleo del anti-FITC-HRP para el marcaje enzimático.

Tal y como se muestra en la Fig. 4.65, este alargamiento artificial del híbrido de interés se lleva a cabo en disolución, en una única etapa de 30 min, mediante la incubación de la secuencia diana con la sonda de detección/precursora (ADNDp-Janus) y las secuencias de ADN lineales modificadas con FITC (FITC-AP1 y FITC-AP2). La secuencia lineal FITC-AP1 puede hibridar, tanto con la ADNDp-Janus, como con dos regiones diferentes de la secuencia FITC-AP2, lo que desencadena una reacción de hibridación en cadena entre las secuencias FITC-AP1 y FITC-AP2, formándose un híbrido concatenado de ADN lineal unidimensional modificado cada 15 bp (Fig. 4.65, [5]) por moléculas de FITC a las que puede unirse el trazador enzimático (anti-FITC-HRP) amplificándose la respuesta electroquímica [Torrente-Rodríguez, 2016-b]. La sonda de detección/precursora (ADNDp-Janus) está diseñada, tanto para la hibridación con el FITC-AP1 por el extremo 3', como con la secuencia diana por el extremo 5', considerándose la secuencia precursora de la amplificación artificial sobre el híbrido formado (secuencia diana/ADNDp-Janus). Aunque la reacción de hibridación en cadena puede darse en disolución, en presencia de la secuencia precursora y de las sondas lineales, los híbridos formados artificialmente sólo pueden capturarse selectivamente sobre los genocaptosres magnéticos en presencia de la secuencia diana [Liu, 2014].

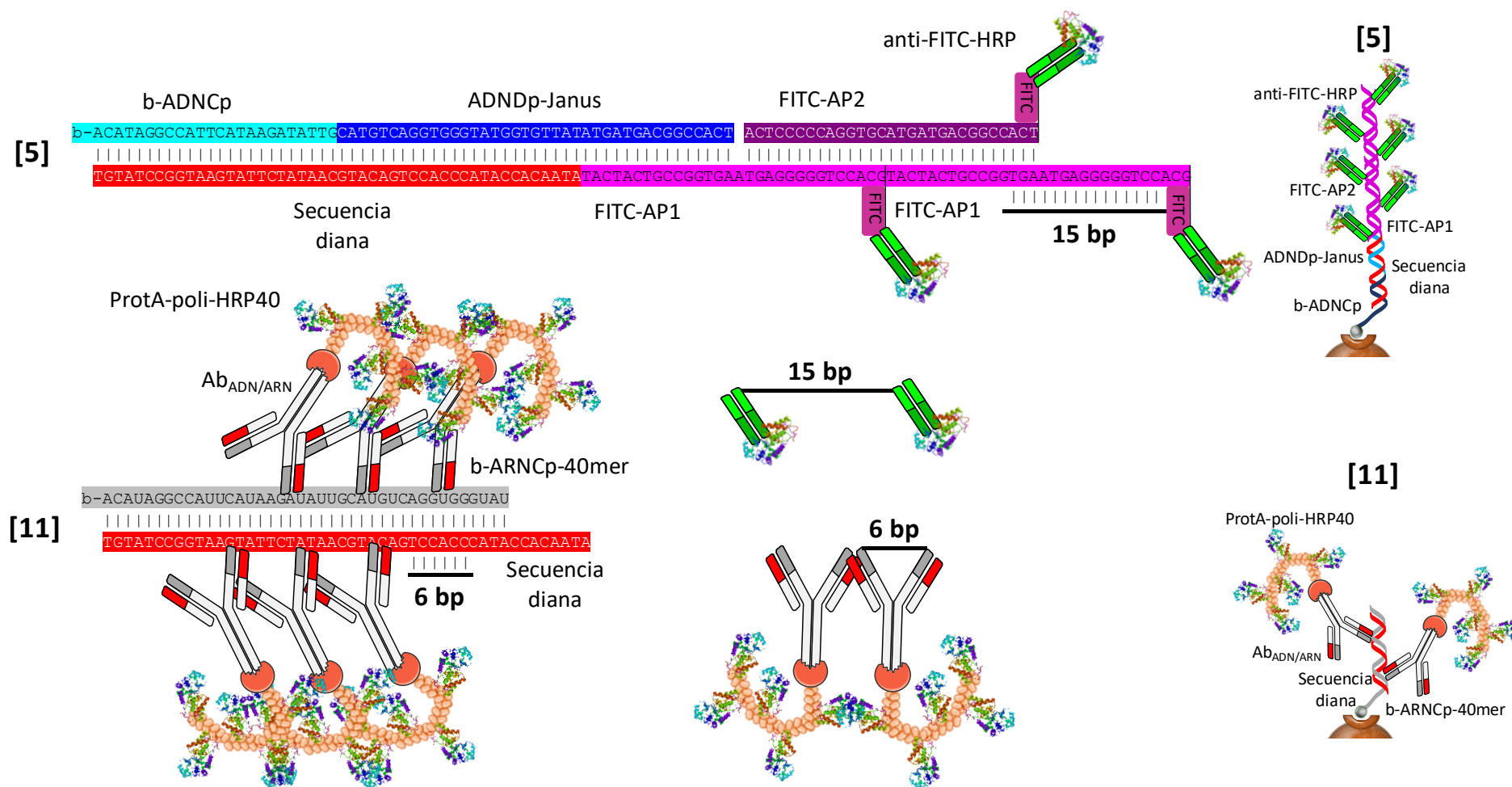


Fig. 4.65: Diagrama esquemático de las secuencias empleadas y espaciado existente entre los trazadores enzimáticos en las estrategias de amplificación basadas en el empleo de concatámeros [5] y de Ab_{ADN/ARN} en combinación con la ProtA-poli-HRP40 [11].

Aunque el diagrama mostrado en la Fig. 4.65 no representa de manera real las dimensiones y procesos de bioeconomiento presentes en las dos estrategias de amplificación ($\text{Ab}_{\text{ADN/ARN-ProtA-poli-HRP40}}$ [11] o concatámeros [5]), se ha representado la secuencia diana en rojo y las demás sondas empleadas para la visualización del espaciado entre cada marcaje enzimático. Según los datos reportados, el $\text{Ab}_{\text{ADN/ARN}}$ reconoce regiones de 6 bp en heterohíbridos de ADN/ARN [Qavi, 2011], lo que supone la inmovilización teórica de 6 anticuerpos por cada heterohíbrido de 40 bp (secuencia diana-b-ARN Cp-40mer), espaciados cada 6 bp. Comparando ambas estrategias de amplificación, podemos concluir que el reconocimiento/marcaje cada 6 bp con un complejo voluminoso como el $\text{Ab}_{\text{ADN/ARN-ProtA-poli-HRP40}}$, puede estar más impedido estéricamente que el formato basado en el empleo de concatámeros, donde la distancia entre las FITC que deben marcarse es el doble (15 bp) y se emplea para el marcaje un reactivo más pequeño (anti-FITC-HRP).

En la Fig. 4.66 se muestran los calibrados construidos con estándares de distinta concentración de la secuencia sintética diana de ADN de 48-mer con ambas metodologías de amplificación ($\text{Ab}_{\text{ADN/ARN-ProtA-poli-HRP40}}$ [11] o concatámeros [5]), y se comparan con los proporcionados por las metodologías empleadas como control, basadas en el empleo de ProtA-HRP [9] y en el formato de hibridación tipo sándwich empleando la FITC-ADNDp [2], respectivamente. Las características analíticas de estos calibrados se resumen en la Tabla 4.24.

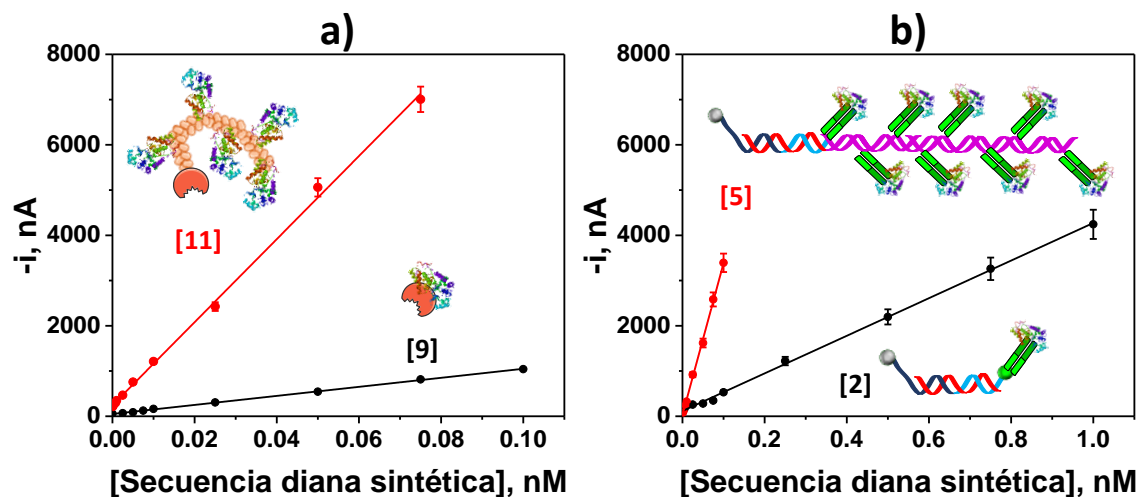


Fig. 4.66: Comparación de los calibrados obtenidos para la determinación de la secuencia de ADN diana sintética empleando las estrategias de amplificación (rojo) basadas en el uso de bioreactivos conjugados con múltiples moléculas del marcador enzimático [11] (a) y el uso de concatámeros [5] (b). Se incluyen con fines comparativos los calibrados obtenidos con las estrategias de control en ausencia de amplificación [9] y [2], respectivamente (negro). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Tabla 4.24. Comparación del factor de amplificación obtenido empleando bioreactivos conjugados con múltiples moléculas de enzima o concatámeros.

Formato	Pendiente, nA nM ⁻¹	Factor de amplificación
ProtA-HRP [9]	(9986 ± 80)	9.2
ProtA-poli-HRP40 [11]	(91796 ± 728)	
FITC-Dp (Sándwich) [2]	(4155 ± 31)	8.1
FITC-Concatámeros [5]	(33522 ± 432)	

Los resultados comparativos mostrados en la Fig. 4.66 y resumidos en la Tabla 4.24. confirman, como era de esperar, la mejora significativa de la sensibilidad obtenida para ambas estrategias de amplificación ([5] y [11]), por el mayor número de moléculas de HRP presentes por híbrido capturado sobre la superficie de las MBs, en comparación con los formatos empleados como control ([2] y [9], respectivamente). El factor de amplificación de 8.1 obtenido en el empleo de secuencias lineales concatenadas modificadas con FITC, es consistente con que hayan transcurrido 4 ciclos de amplificación, comprendiendo cada ciclo un híbrido FITC-AP1/FITC-AP2 y por lo tanto, dos moléculas de FITC por ciclo.

Sin embargo, el factor de amplificación alcanzado de 9.2 con el empleo del Ab_{ADN/ARN} conjugado a la ProtA-poli-HRP40, aunque significativo, como se apuntó en el apartado 4.3.2.5, es inferior al que cabría esperar, teniendo en cuenta la presencia de 40 moléculas de HRP por cada ProtA inmovilizada en los Ab_{ADN/ARN} unidos a los heterohíbridos formados. Estos resultados sólo pueden justificarse por la unión de menos unidades del complejo Ab_{ADN/ARN}-ProtA-poli-HRP40 por cada heterohíbrido formado, posiblemente debido, como se comentó anteriormente, a que el gran tamaño de este complejo dificulta, por impedimento estérico, el reconocimiento de regiones tan pequeñas de 6 bp en heterohíbridos.

Comparando ambas estrategias de amplificación, se obtuvo una sensibilidad 2.6 veces mayor empleando Ab_{ADN/ARN}-ProtA-poli-HRP40 en comparación con el uso de concatámeros (pendientes 91796 [11] vs. 33522 nA nM⁻¹ [5], respectivamente), y un LD 2.5 veces inferior (0.12 [11] vs. 0.3 pM [5], respectivamente). Estos resultados confirman, pese a la menor sensibilidad, la mayor eficiencia de marcaje enzimático cuando se emplean concatámeros y un trazador conjugado con una única molécula de enzima, como resultado del mayor espaciamiento entre las zonas de marcaje y el empleo de fragmentos de anticuerpos conjugados con HRP.

Resulta importante destacar en este punto, la importancia del control de la longitud y espaciamiento de las unidades a marcar con el fin de lograr la mayor eficiencia en las reacciones de bioreconocimiento que permiten amplificar la respuesta en biosensores de ácidos nucleicos. Estos resultados ponen de manifiesto la posibilidad de explorar novedosas estrategias de amplificación, basadas en el empleo de fragmentos de anticuerpos para el reconocimiento de heterohíbridos de ADN/ARN, con el fin de minimizar los problemas de impedimento estérico, o en la combinación de las estrategias de amplificación basadas en el alargamiento de la longitud del heterohíbrido, empleando concatámeros, y su reconocimiento con bioconjugados con múltiples marcadores enzimáticos, aprovechando las ventajas de ambas estrategias de amplificación (empleo de reactivos con múltiples unidades de enzima para marcar unidades espaciadas al menos 15 bp).

4.3.2.7. Análisis comparativo de las prestaciones analíticas alcanzadas para cada plataforma genosensora desarrollada

Para finalizar, se van a comparar las 11 plataformas biosensoras amperométricas desarrolladas para la determinación de ácidos nucleicos a partir de las características analíticas resumidas en el apartado 4.3.2.2 (Tabla 4.23). De forma comparativa, la Fig. 4.67 muestra las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia o presencia de estándares de 75 pM de la secuencia sintética diana, empleando las estrategias más sensibles de los 5 tipos de formatos de ensayo evaluados.

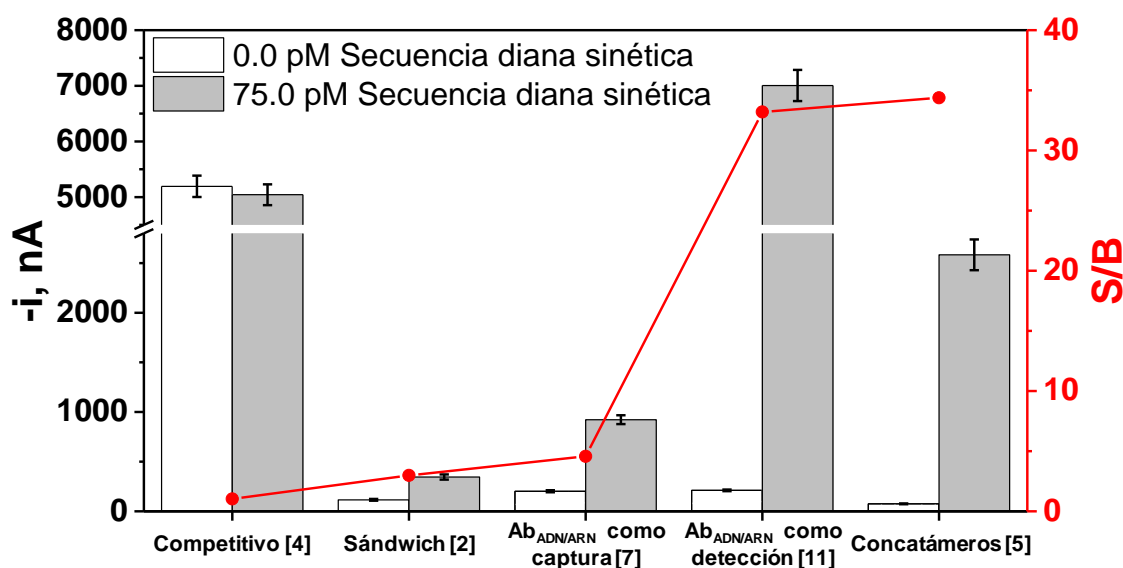


Fig. 4.67: Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B, barras blancas) y en presencia de estándares de 75.0 pM de la secuencia sintética diana de ADN de 48-mer (S, barras grises), así como la relaciones S/B resultantes (línea roja), para los formatos de ensayo evaluados.

Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados mostrados en la Fig. 4.67 y las características analíticas resumidas en la Tabla 4.23, demuestran los factores de amplificación obtenidos en comparación con la metodología convencional basada en el empleo de formatos de hibridación tipo sándwich y de Estrep-HRP como marcador enzimático [1]. Es importante destacar que todas las plataformas evaluadas, a excepción de los formatos competitivos, mejoran la sensibilidad, en comparación con la metodología convencional, proporcionando factores

de amplificación comprendidos entre 3.3 y 771. Además, excepto los formatos competitivos, cuyos LDs son 2.0–2.8 veces superiores en comparación con la metodología convencional (312 [4] o 442 [3] vs. 157 pM [1]), los diferentes ensayos evaluados han proporcionado LDs entre 58 (2.7 pM [6]) y 1308 (0.12 pM [11]) veces inferiores al formato tipo sándwich convencional (157 pM [1]), o incluso 33 veces inferior empleando el mismo formato de ensayo, pero con sondas modificadas con FITC y anti-FITC-HRP para el marcaje enzimático (4.8 pM [2]). En todos los casos los tiempos de análisis están comprendidos entre 1 y 2 h.

Es importante destacar también, que la comparación del empleo del anticuerpo Ab_{ADN/ARN}, tanto como bioelemento de captura o de detección, y la posibilidad de modular la sensibilidad del ensayo en función de la longitud del heterohíbrido y del número de anticuerpos inmovilizados sobre este, se ha explorado de forma pionera en nuestro Grupo de Investigación.

Los resultados obtenidos en este apartado demuestran la gran influencia de variables como la longitud de los híbridos o las estrategias y bioreactivos utilizados para el marcaje enzimático en la implementación de plataformas biosensoras electroquímicas. Se ha demostrado, además, la posibilidad de mejorar significativamente la sensibilidad de la estrategia convencional en factores de amplificación de 282 y 771 mediante estrategias basadas en el empleo de concatámeros [5] o conjugados con múltiples moléculas de HRP [11], respectivamente. Cabe destacar en este punto, la relevancia de estudios futuros dedicados a comparar reactivos para marcaje enzimático de diferente tamaño y/o al control del espaciado entre las zonas a marcar con el fin de mejorar la eficiencia de las reacciones de bioreconocimiento, y por tanto, las prestaciones de las estrategias diseñadas.

Los resultados obtenidos en este apartado se han explotado muy satisfactoriamente hasta la fecha en el desarrollo de metodologías electroanalíticas sencillas y competitivas para la determinación sensible y selectiva de ADNs de relevancia en muestras de origen vegetal y animal, directamente en ADN genómico y mitocondrial sin fragmentar ni amplificar y de microARNs en extractos de ARN total de gran relevancia clínica actual. Estas bioplataformas han demostrado aplicabilidad para detectar procesos de adulteración de carne de ternera con carne de caballo (apartado 4.3.3), de alérgenos de relevancia en el tomate [Pereira-Barros, 2019] y de microARNs

en muestras complejas (tejidos tumorales parafinados) de pacientes oncológicos [Torrente-Rodríguez, 2016-a], [Torrente-Rodríguez, 2016-c], [Vargas, 2017].

Todos estos resultados y la versatilidad que ofrecen estas plataformas, las hace especialmente adecuadas para la determinación de otros ácidos nucleicos de relevancia, independientemente de su variedad natural (ADN o ARN), origen (animal o vegetal), número de copias (mitocondriales o genómicas) y longitud (desde ácidos nucleicos intactos muy largos hasta muestras degradadas, difíciles de analizar mediante metodologías convencionales basadas en PCR).

Además de las atractivas y relevantes aplicaciones ya comentadas, estamos convencidos de que los resultados de este trabajo resultarán determinantes para el desarrollo de futuras plataformas biosensoras, tanto ópticas como electroquímicas. Estas investigaciones nos han permitido adquirir el conocimiento y la experiencia necesaria para proporcionar nuevas herramientas de gran interés y a demanda, para la determinación rutinaria y descentralizada de analitos de gran relevancia a nivel genético o regulatorio en los ámbitos clínico (ADNs tumorales, ARNs no codificantes como microARNs y ARNs largos, biomarcadores epigenéticos, ADNs de oncovirus, etc.) y de seguridad alimentaria (alérgenos y adulteraciones).

4.3.3. Biosensor para la detección de adulteraciones con carne de caballo

En este apartado se discuten los resultados más relevantes de los artículos: *Ruiz-Valdepeñas Montiel et al. Disposable amperometric PCR-free biosensor for direct detection of adulteration with horsemeat in raw lysates targeting mitochondrial DNA. Anal. Chem. 89 (2017) 9474–9482* y *Ruiz-Valdepeñas Montiel y col. Biosensor electroquímico para la detección de adulteraciones con carne de caballo. Eurocarne 262 (2017) 79–88*, aportados como anexos al final de esta Tesis Doctoral.

Teniendo en cuenta los escándalos alimentarios recientes surgidos en Europa por adulteraciones con carne de caballo, que afectan directamente a la confianza y/o salud de los consumidores, y la falta de metodologías sencillas capaces de detectarlas al nivel exigido por la legislación y en ausencia de etapas previas de amplificación del material

genético, en este apartado se discute la aplicación de una de las plataformas biosensoras desarrolladas en el apartado 4.3.2 (en particular la basada en el formato [11]), para la detección sensible y selectiva de un fragmento específico de la región *D-loop* del ADN mitocondrial de caballo, seleccionado como biomarcador de adulteración.

La metodología desarrollada está basada en un formato de hibridación ADN/ARN tipo directo, implementado sobre la superficie de MBs, y en el marcaje del heterohíbrido resultante con el anticuerpo Ab_{ADN/ARN} y el conjugado comercial de ProtA-poli-HRP40.

En la Fig. 4.68 se muestra un diagrama esquemático de los fundamentos involucrados en la metodología desarrollada. Brevemente, las Estrep-MBs se modifican con una sonda específica de ARN biotinilada de 40 mer, y se emplean para capturar selectivamente la secuencia de ADN diana por hibridación directa. Los heterohíbridos de ADN/ARN resultantes inmovilizados en la superficie de las MBs se marcan enzimáticamente con el Ab_{ADN/ARN}, previamente incubado con la ProtA-poli-HRP40. Tras su modificación, los bioconjugados magnéticos resultantes se capturan sobre la superficie de un SPCE y se realiza la transducción amperométrica a -0.20 V (frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag) monitorizándose la reducción enzimática del H₂O₂ mediada por la hidroquinona (HQ). La variación de la corriente catódica obtenida resulta proporcional a la concentración de ADN diana en la muestra analizada.

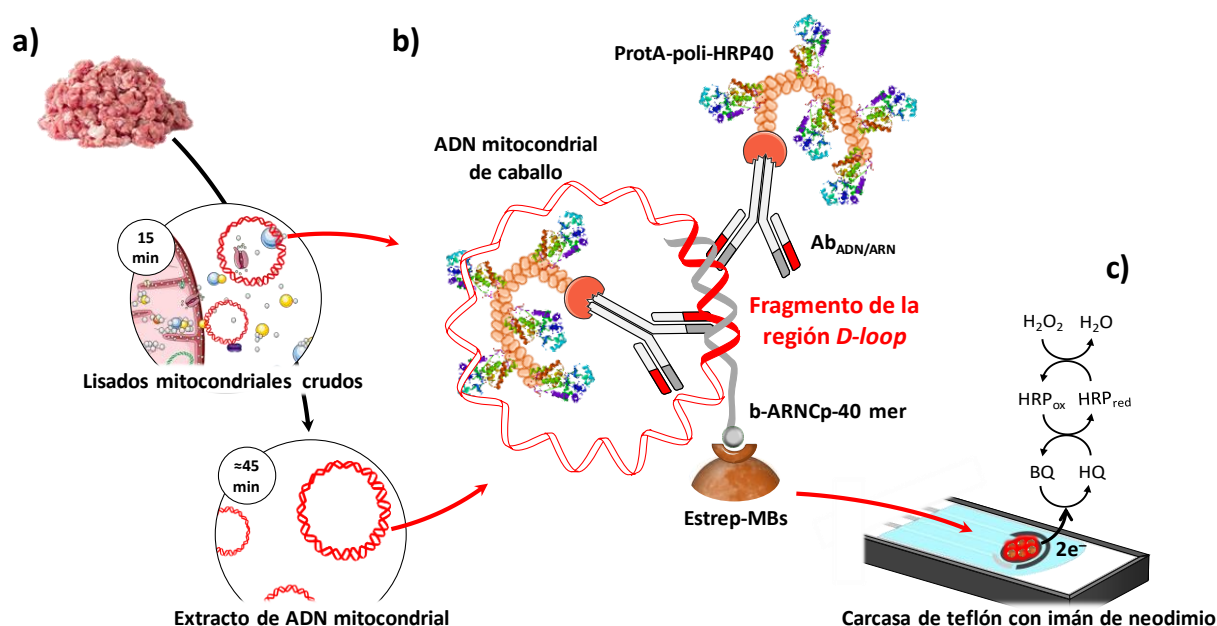


Fig. 4.68: Diagrama esquemático de las muestras analizadas (lisados mitocondriales crudos y extractos de ADN mitocondrial) a), plataforma biosensora desarrollada para la determinación de un fragmento característico de la región D-loop del ADN mitocondrial de caballo b) y conjunto biosensor-SPCE-carcasa con imán de neodimio y reacciones implicadas en la detección amperométrica empleando el sistema H_2O_2/HQ c).

A continuación, se muestra el calibrado obtenido para la determinación amperométrica de estándares de diferente concentración del ADN sintético diana (preparados en solución bloqueante de caseína) y los resultados obtenidos en la evaluación de la estabilidad de los genocaptadores empleados (Fig. 4.69) trabajando en las condiciones experimentales optimizadas resumidas en la Tabla 4.22.

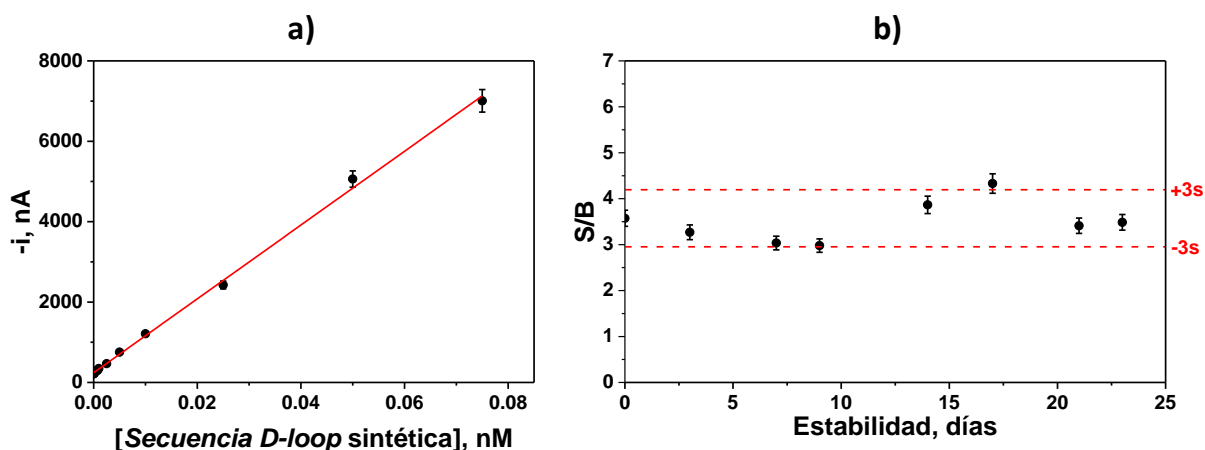


Fig. 4.69: a) Calibrado obtenido para la determinación amperométrica de estándares del ADN diana con el biosensor desarrollado. b) Relación resultante ($S(5.0 \text{ pM})/B$) entre las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de ADN diana durante la evaluación de la estabilidad de los genocaptadores (*b*-ARNCp-40mer-MBs) almacenados en B&W filtrado a 4°C . Gráfico de control construido tomando como valor medio la relación S/B obtenida para 10 inmunosensores preparados el primer día de estudio (día de preparación de los *b*-ARNCp-40mer-MBs) y como límites superior e inferior $+3s$ y $-3s$, respectivamente, de dicho valor medio siendo “s” la desviación estándar que resulta para los 10 valores de S/B obtenidos. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Las características analíticas y operacionales que proporciona la plataforma biosensora amperométrica desarrollada para la determinación de la secuencia diana sintética, se resumen en la Tabla 4.25.

Tabla 4.25. Características analíticas y operacionales que proporciona la plataforma biosensora desarrollada para la determinación amperométrica de estándares del ADN diana.

Parámetro	Valor
r	0.998
Pendiente, nA nM ⁻¹	(91796 ± 728)
Ordenada en el origen, nA	(244 ± 20)
Intervalo lineal, pM	0.39 – 75.0
LD, pM	0.12 (3.0 amoles)
LC, pM	0.39 (9.75 amoles)
RSD _(n=8, 5.0 pM) , %	4.0
Estabilidad, días	23

Además de las características analíticas, comentadas en el apartado 4.3.2, se evaluó la estabilidad de los genocaptoreos (b-ARN Cp-40mer-MBs) almacenados a 4 °C en disolución reguladora B&W filtrada. Los resultados obtenidos demuestran que los biosensores preparados a partir de los mismos, proporcionan respuestas sin pérdida significativa de sensibilidad durante al menos 23 días (no se evaluaron tiempos superiores), lo que confirma la posibilidad de preparar y almacenar estos genocaptoreos, base del biosensor desarrollado, durante este periodo hasta el momento que se requiera su empleo para la determinación.

4.3.3.1. Aplicación al análisis de extractos de ADN

Con el fin de demostrar la aplicabilidad de los biosensores desarrollados para la determinación de ADN mitocondrial, se ensayaron diferentes protocolos para su extracción. Se empleó un kit comercial para la extracción de ADN genómico de tejido animal (G-Spin Total DNA extraction kit) (I) y dos protocolos que incluían: el aislamiento previo de la masa mitocondrial presente en la muestra mediante centrifugación y la posterior extracción del ADN utilizando el mismo kit comercial mencionado anteriormente (II) o un kit de extracción de ADN plasmídico (Speedtools

DNA extraction kit) (III), teniendo en cuenta las características similares de los ADNs plasmídicos y mitocondriales.

Los extractos de ADN resultantes se analizaron directamente con la plataforma biosensora desarrollada (100 ng de ADN_t preparados en solución bloqueante de caseína), o mediante estrategias de amplificación del material genético por PCR y electroforesis en gel, empleando los protocolos descritos en el apartado 3.3.2 para la amplificación de un fragmento de 144 bp del ADN mitocondrial de caballo, que incluye el fragmento diana de interés. Los resultados proporcionados por ambas metodologías se muestran en la Fig. 4.70.

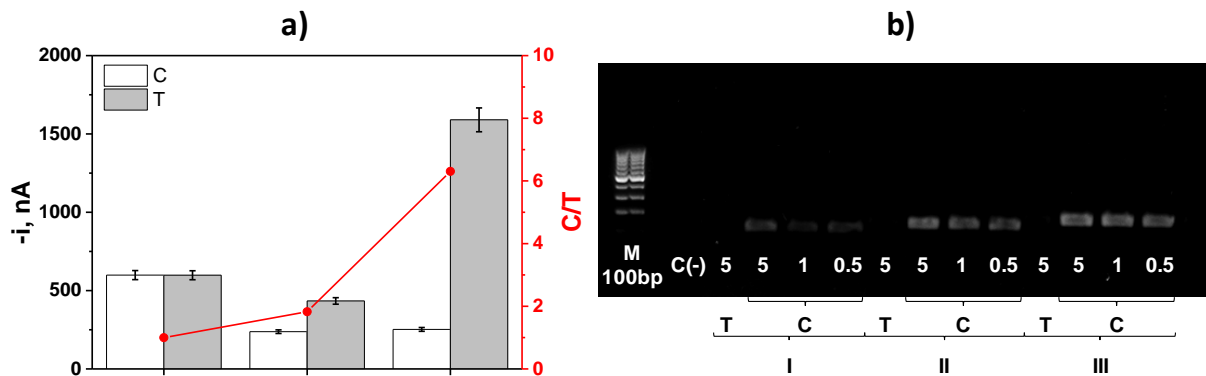


Fig. 4.70. a) Respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores desarrollados en el análisis de 100 ng de ADN extraído de carne de ternera (T, barras blancas) y caballo (C, barras grises) y relaciones resultantes (C/T, línea roja). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$). b) Detección por electroforesis en gel de agarosa (1.8 %) de los productos de amplificación obtenidos por PCR empleando 5.0, 1.0 y/o 0.5 ng de ADN mitocondrial extraído de carne de ternera (T) o caballo (C). C(-): control negativo en ausencia de ADN y M 100 bp: marcador de 100 bp. Protocolos de extracción empleados: G-Spin Total DNA extraction kit (I) y aislamiento previo de la masa mitocondrial y extracción empleando G-Spin Total DNA extraction kit (II) o Speedtools DNA extraction kit (III).

Los resultados obtenidos con ambas metodologías confirman que la mejor discriminación entre los ADNs mitocondriales extraídos de carne de caballo y ternera (mejor relación C/T) se obtiene empleando el protocolo III, basado en el aislamiento previo de la masa mitocondrial mediante centrifugación y la posterior extracción específica del ADN mitocondrial.

Es importante destacar que en ningún caso se obtiene amplicón a partir del ADN extraído de carne de ternera (Fig. 4.70, b), lo que confirma la adecuación, tanto de los

cebadores diseñados para la amplificación, como del fragmento diana seleccionado como biomarcador de adulteración. De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionó el protocolo III como óptimo para estudios posteriores.

La sensibilidad de la metodología desarrollada para la determinación de carne de caballo se evaluó analizando diferentes cantidades, comprendidas entre (5.0–750.0) ng de ADN mitocondrial total extraído, empleando el protocolo seleccionado (III) y tras una simple etapa de desnaturalización.

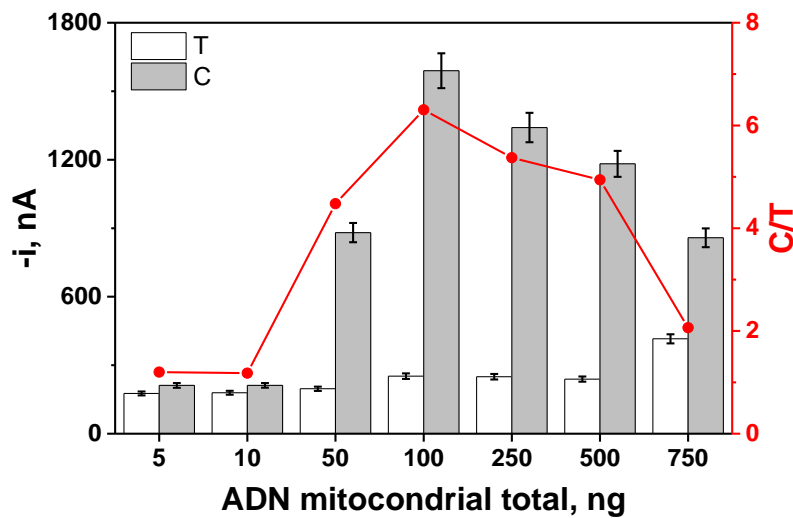


Fig. 4.71: Respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores desarrollados en el análisis de diferentes cantidades de ADN mitocondrial extraídas de carne de ternera (T, barras blancas) y caballo (C, barras grises) y relación resultante (C/T, línea roja). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Como se puede observar en la Fig. 4.71, la plataforma biosensora desarrollada discrimina claramente la presencia de carne de caballo o ternera empleando cantidades de ADN mitocondrial iguales o superiores a 50 ng, sin necesidad de aplicar protocolos previos de fragmentación ni de amplificación previa del material genético por PCR y tras una simple etapa de desnaturalización. Estos resultados demuestran, además, que la mejor discriminación se obtiene empleando 100 ng de extracto de ADN mitocondrial. La disminución de las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de cantidades superiores a 100 ng de ADN_t mitocondrial extraído de carne de caballo, puede atribuirse al “efecto hook” producido cuando la concentración de ADN diana excede la de la sonda de ARN de captura inmovilizada sobre la superficie de las MBs [Vetrone, 2012].

En este punto, cabe destacar la relevancia de estos resultados teniendo en cuenta que, después del protocolo de extracción utilizado, la mayoría de las moléculas de ADN mitocondrial extraídas deberían estar intactas y su longitud es 347 veces superior (~16660 bp) a la secuencia de ADN sintética de 48-mer empleada para la optimización de la metodología y establecimiento de sus características analíticas.

La elevada sensibilidad que proporciona esta metodología puede atribuirse a la contribución de varios factores: i) a la amplificación de la respuesta electroquímica obtenida empleando el Ab_{ADN/ARN} y la ProtA-poli-HRP40 para el reconocimiento de heterohíbridos de 40 bp, ii) a la naturaleza del fragmento de interés seleccionado, ya que el ADN mitocondrial está constituido por un menor número de genes, en comparación con el ADN genómico, pero con un mayor número de copias por gen, y iii) a las características del protocolo de extracción empleado, que permite el aislamiento y pre-concentración de la masa mitocondrial presente en la muestra mediante centrifugación y mejora el rendimiento de la extracción del ADN mitocondrial empleando un kit de extracción de ADN plasmídico de bacterias (Speedtools DNA extraction kit), de características y propiedades similares al ADN mitocondrial.

4.3.3.2. Aplicación al análisis de lisados mitocondriales crudos

Con objeto de simplificar todavía más el protocolo y minimizar el tiempo de ensayo, se evaluó la posibilidad de realizar la determinación directamente en lisados mitocondriales crudos, sin extracción previa del ADN mitocondrial. Para ello, se llevó a cabo el aislamiento previo de la masa mitocondrial presente en la muestra y su posterior lisis alcalina, como se describe en el apartado 3.3.1.

Los lisados mitocondriales crudos obtenidos se analizaron directamente con la plataforma biosensora desarrollada, previa dilución en disolución bloqueante de caseína. Las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia o presencia de ADN mitocondrial de caballo empleando extractos de ADN_t mitocondrial (protocolo III) o lisados mitocondriales crudos, se comparan en la Fig. 4.72.

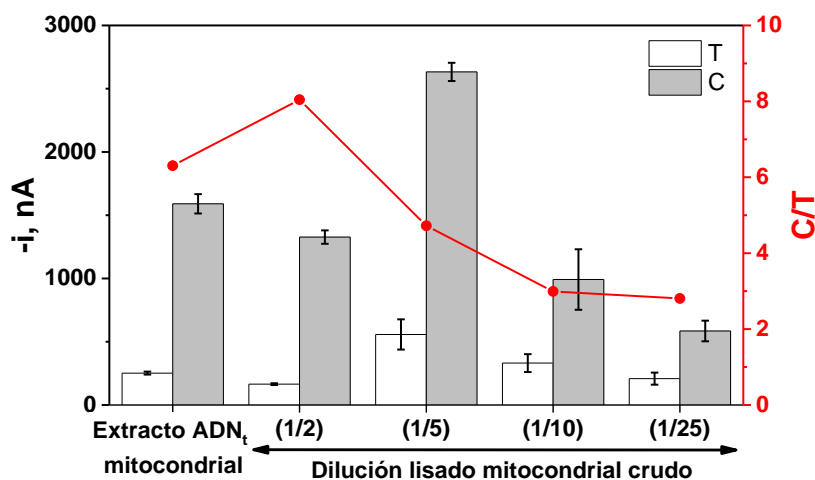


Fig. 4.72: Respuestas amperométricas proporcionadas por los biosensores desarrollados en el análisis de 100 ng de extractos de ADN_i mitocondrial y lisados mitocondriales crudos (diluidos 2–25 veces en disolución bloqueante de caseína) obtenidos a partir de 3.0 g de muestras de carne de ternera (T, barras blancas) y caballo (C, barras grises) y relación resultante (C/T, línea roja). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar (n=3).

Los resultados mostrados (Fig. 4.72) demuestran la posibilidad de discriminar claramente entre carne de ternera o caballo directamente en lisados mitocondriales crudos, tras ser diluidos en solución bloqueante de caseína, obteniendo la mejor relación (C/T) empleando una dilución 1:1 del lisado mitocondrial (dilución 1/2 en la Fig. 4.72), con respuestas amperométricas similares a las obtenidas empleando 100 ng de ADN_i mitocondrial extraído con el protocolo III (apartado 4.3.3.1). Estos resultados demuestran la capacidad de la metodología desarrollada para identificar este tipo de adulteración directamente en extractos de elevada complejidad, obtenidos en tan sólo 15 min por simple aislamiento de la masa mitocondrial mediante centrifugación.

4.3.3.3. Evaluación de la selectividad

Con el fin de demostrar la aplicabilidad de la plataforma biosensora para la detección inequívoca de la presencia de carne de caballo, se llevó a cabo la evaluación de la selectividad de la metodología desarrollada en el análisis de lisados mitocondriales crudos obtenidos a partir de 3.0 g de muestras de carne de caballo y de otras carnes comerciales empleadas convencionalmente (pollo, cerdo, pavo y ternera), diluidos 1:1

en disolución bloqueante de caseína. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.73.

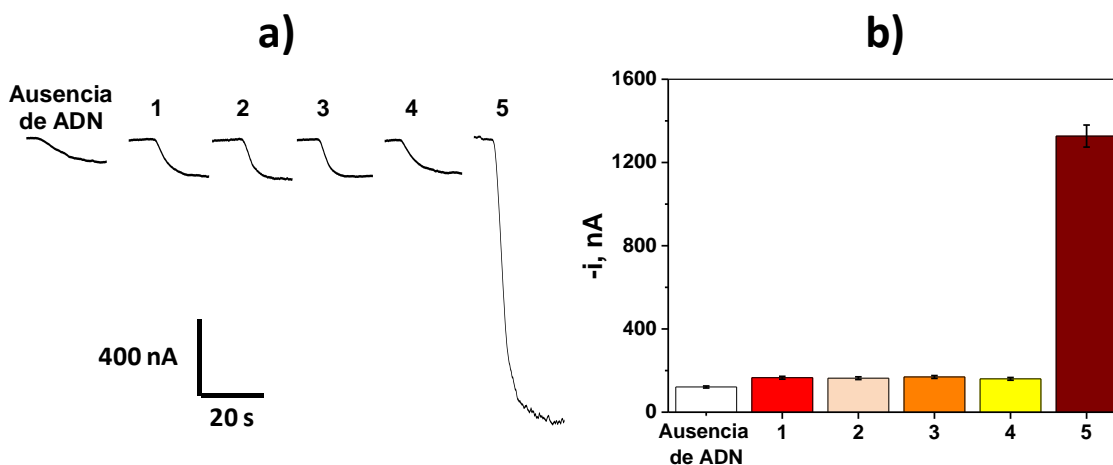


Fig. 4.73: Amperogramas a) y respuestas amperométricas b) obtenidas con los biosensores desarrollados en ausencia de ADN y para lisados mitocondriales crudos obtenidos de muestras de carne de ternera (1), pavo (2), cerdo (3), pollo (4) y caballo (5) diluidos 1:1 en disolución bloqueante de caseína. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados demuestran que los biosensores proporcionan respuestas amperométricas significativamente diferentes a las obtenidas en ausencia de ADN diana (Fig. 4.73, barra blanca) únicamente para el lisado procedente de carne de caballo, lo que pone de manifiesto la elevada especificidad, tanto de la sonda de ARN de captura empleada en la fabricación de los genocaptadores, como del fragmento característico de la región *D-loop* del ADN mitocondrial seleccionado para la identificación inequívoca de la presencia de carne de caballo.

4.3.3.4. Aplicación al análisis de adulteraciones alimentarias con carne de caballo

Con el fin de evaluar el límite de detección real de la metodología desarrollada se analizaron muestras de carne de ternera sin adulterar y adulteradas con diferentes porcentajes de carne de caballo, preparadas como se describe en el apartado 3.3.7.3, analizando directamente los lisados mitocondriales crudos, obtenidos a partir de 3.0 g

de cada mezcla preparada, diluidos 1:1 en disolución bloqueante de caseína. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.74.

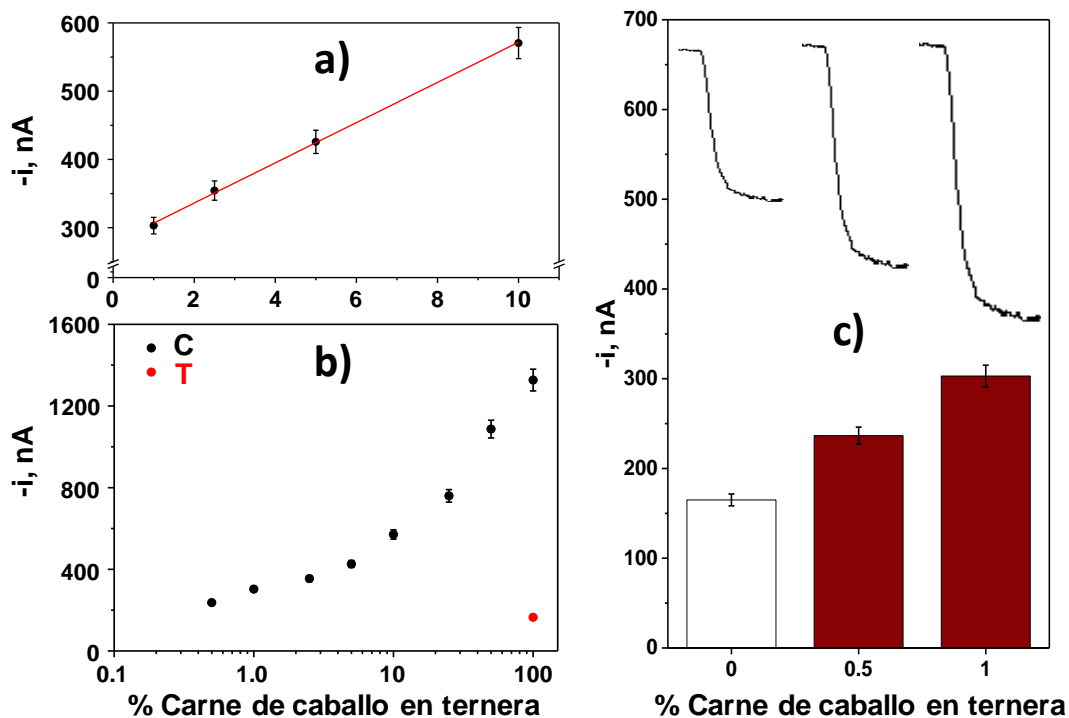


Fig. 4.74: a) Dependencia lineal obtenida entre las respuestas amperométricas proporcionadas por los biosensores desarrollados y el porcentaje de carne de caballo con el que se adultera la carne de ternera en el intervalo comprendido entre (1.0–10.0) % (p/p). b y c) Amperogramas y respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores desarrollados en el análisis de lisados mitocondriales diluidos 1:1 en disolución bloqueante de caseína, para muestras de carne de ternera sin adulterar (puntos rojos en b), barra blanca en c)) o adulteradas con distintos porcentajes de carne de caballo en el intervalo comprendido entre (0.5–100.0) % (p/p) (puntos negros en b), barras granates en c)). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n=3$).

Como se puede observar, los biosensores desarrollados permiten discriminar claramente entre muestras de carne de ternera sin adulterar y adulterada con diferentes porcentajes de carne de caballo en el intervalo comprendido entre (0.5–100.0) % (p/p) (Fig. 4.74, b). Resulta destacable la posibilidad de detectar, con diferencias estadísticamente significativas (95 %, $n=10$), la presencia de tan sólo un 0.5 % (p/p) de carne de caballo en ternera (Fig. 4.74, c), que es el nivel requerido por la legislación europea para este tipo de adulteraciones [2014/180/UE].

Además, se encontró una dependencia lineal entre las respuestas amperométricas que proporcionaban los biosensores y el porcentaje de adulteración de carne de ternera con caballo en el intervalo comprendido entre (1.0–10.0) % (p/p) ($r = 0.999$) (Fig. 4.74, a), con una pendiente de $(29 \pm 2) \text{ nA } \%^{-1} \text{ (p/p)}$ y ordenada en el origen de $(277 \pm 14) \text{ nA}$. Estos resultados demuestran la utilidad de la metodología desarrollada no sólo para la detección, sino también con fines de cuantificación, del porcentaje de adulteración en este intervalo.

Para concluir este apartado es importante destacar que se trata de la primera plataforma biosensora electroquímica descrita hasta la fecha para la identificación inequívoca de carne de caballo mediante la detección selectiva y sensible de un fragmento específico de la región *D-loop* de su ADN mitocondrial, y que permite realizar la detección de carne equina directamente en lisados de células mitocondriales crudas sin previa extracción o amplificación del ADN, en tan solo 75 min.

Los resultados discutidos confirman el desarrollo de una plataforma biosensora sencilla, sensible y selectiva para la detección amperométrica de secuencias diana de oligonucleótidos, fácilmente miniaturizable y automatizable. Además, la elevada versatilidad de estas metodologías para trasladarse a la determinación de otros ácidos nucleicos de mamíferos, hace que se ofrezcan como herramientas muy atractivas tanto para la detección de adulteraciones que involucren otro tipo de carne animal (ej. presencia de carne de cerdo en productos para la comunidad musulmana), como para el cribado de especies animales presentes en muestra cárnicas.

4.4. Desarrollo de biosensores enzimáticos basados en recubrimientos protectores poliméricos de disolución controlada

En este apartado se recogen los resultados obtenidos durante la estancia predoctoral realizada en la Universidad de California, San Diego, bajo la supervisión del Prof. Joseph Wang. Las investigaciones desarrolladas están basadas en el empleo de recubrimientos poliméricos temporales, sensibles al pH, para la modificación y protección de superficies (bio)sensores, para su aplicación al análisis directo de fluidos biológicos.

4.4.1. Sensores de activación retardada basados en el empleo de recubrimientos protectores poliméricos de disolución controlada en el tiempo para el (bio)sensado continuo en medios biológicos de elevada complejidad

En este apartado se discuten los resultados más relevantes del artículo: *Ruiz-Valdepeñas Montiel et al. Delayed sensor activation based on transient coatings: biofouling protection in complex biofluids. J. Am. Chem. Soc. 140 (2018) 14050–14053*, aportado como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

Debido a las ventajas únicas que ofrecen para la monitorización de biomarcadores de relevancia en el organismo, en la actualidad, el desarrollo de plataformas biosensoras electroquímicas en dispositivos implantables o portátiles mínimamente invasivos es un campo de gran actividad actual. Sin embargo, a pesar de estas atractivas características, su aplicación “in situ” en fluidos biológicos durante tiempo prolongado se ve limitada por los procesos de ensuciamiento gradual de la superficie (bio)sensora que tienen lugar por la acumulación de macromoléculas presentes en fluidos biológicos. Por ello, en este trabajo se ha desarrollado un nuevo enfoque que pretende resolver esta problemática

mediante el empleo de polímeros capaces de proteger la superficie sensora hasta el momento de realizar la medida electroquímica.

La metodología desarrollada está basada en el empleo de polímeros comerciales biocompatibles sensibles al pH y de disolución controlada, que se depositan sobre la superficie (bio)sensora protegiéndola temporalmente de procesos de adsorción indeseables durante su incubación prolongada en el fluido biológico de interés. Estos recubrimientos temporales con base de metacrilato permiten, tras su disolución, la activación del (bio)sensor, dejando expuesta su superficie “intacta” sólo en el momento deseado. El tiempo necesario para disolver el recubrimiento se puede modular a voluntad variando la densidad y/o espesor de la capa de polímero depositada.

A continuación, se muestra de forma esquemática el concepto de la metodología. La plataforma multisensora desarrollada está formada por cuatro electrodos de trabajo con capacidad de activación temporal y secuencial (0, 2, 4 o 6 h), mediante la modificación individual de la superficie de cada electrodo de trabajo con diferentes capas de recubrimiento del polímero Eudragit L100 (que se disuelve a $\text{pH} \geq 6$) [Cetín, 2010]. La monitorización se realiza empleando voltamperometría cíclica (CV) y el sistema redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$.

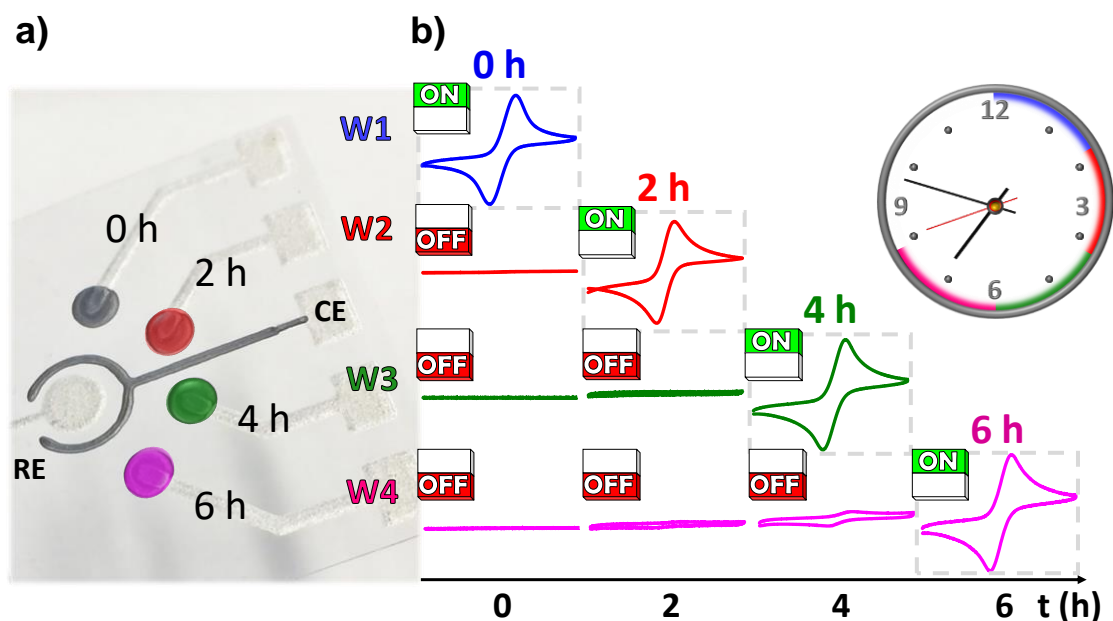


Fig. 4.75: a) Imagen real de la plataforma multisensora electroquímica con activación retardada, basada en la modificación de la superficie de cada electrodo de trabajo (W1–W4) con 0, 1 (rojo), 2 (verde) o 3 (violeta) capas del recubrimiento polimérico con Eudragit L100 al 16 %, respectivamente. b) Voltamperogramas obtenidos a tiempos específicos para cada electrodo de trabajo en función de su recubrimiento. CV: 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en PBS (0.1 M, pH 6,5), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

4.4.1.1. Optimización y evaluación de la disolución y activación controlada en el tiempo

En primer lugar, se evaluó la posibilidad de controlar la disolución temporal de estos recubrimientos, con base de metacrilato, mediante la variación de algunos factores básicos como su densidad (porcentaje de polímero en disolución depositado sobre el electrodo) o espesor (número de capas depositadas de polímero con el mismo porcentaje). Para ello, se compararon los voltamperogramas cíclicos obtenidos en presencia del sistema redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ sobre electrodos individuales de carbono (WEs) modificados con una sola capa de polímero empleando soluciones precursoras con diferente porcentaje del polímero (4.0, 8.0 o 16.0) % (p/v) o con diferente número de capas (1–3), depositadas de forma secuencial, a partir de una disolución precursora que contiene un 16.0 % (p/v) de polímero.

Los resultados obtenidos, mostrados en la Fig. 4.76, demuestran el tiempo al que se disuelve completamente cada uno de los recubrimientos ensayados, exponiendo el 100 % de la superficie sensora a la disolución de medida.

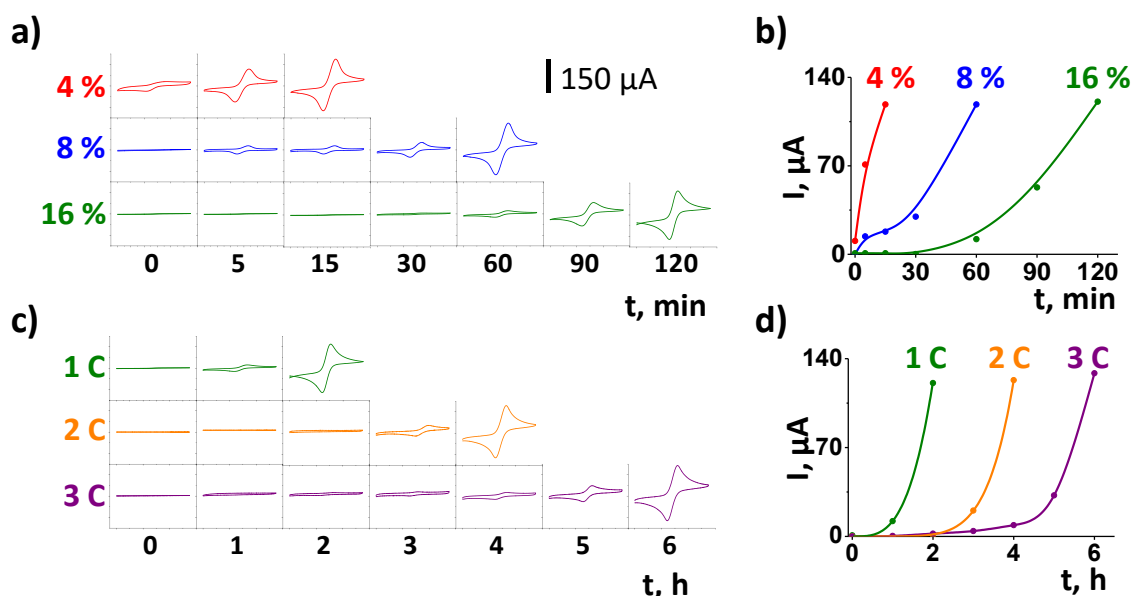


Fig. 4.76: Voltamperogramas cíclicos (a, c) e intensidades de oxidación (b, d) obtenidos en función del tiempo para electrodos modificados con una capa del recubrimiento protector a partir de disoluciones precursoras que contienen diferentes % de polímero: 4.0 (rojo), 8.0 (azul) y 16.0 (verde) % (a, b), o con diferente número de capas del recubrimiento preparadas a partir de una disolución precursora de polímero al 16.0 % (1 (verde), 2 (naranja) y 3 (violeta) capas (C)) (c, d). CV: 5 mM $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ en PBS (0.1 M, pH 6,5), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Los resultados obtenidos variando la densidad de la capa protectora (Fig. 4.76, a, b), confirman el mayor tiempo de retraso de la activación del sensor, de 120 min, con el empleo de recubrimientos preparados a partir de una disolución precursora del polímero al 16.0 %, en comparación con el 100 % de activación observada a los 15 o 60 min con los recubrimientos que resultan con disoluciones precursoras del 4.0 u 8.0 %, respectivamente. Estos resultados demuestran, como era de esperar, la dependencia del tiempo de disolución del recubrimiento en función de su densidad, a su vez dependiente del porcentaje del polímero en la disolución precursora que se emplea para su deposición.

En cuanto a la influencia del espesor del recubrimiento, los resultados se muestran en la Fig. 4.76 (c), (d). Como era de esperar, al aumentar el número de capas se produce un aumento del tiempo de disolución del recubrimiento polimérico. Además, se puede

apreciar como cada capa adicional aumenta el tiempo de disolución del recubrimiento en 2 h. Estos resultados demuestran la posibilidad de predecir con antelación el tiempo de activación de la fase sensora dependiendo del número de capas depositadas.

Además, se realizó una caracterización adicional del proceso de modificación de los WEs y disolución de los recubrimientos transitorios mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, se emplearon WEs sin modificar o modificados secuencialmente con 1, 2 o 3 capas del recubrimiento polimérico al 16.0 % suplementado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), (Fig. 4.77).

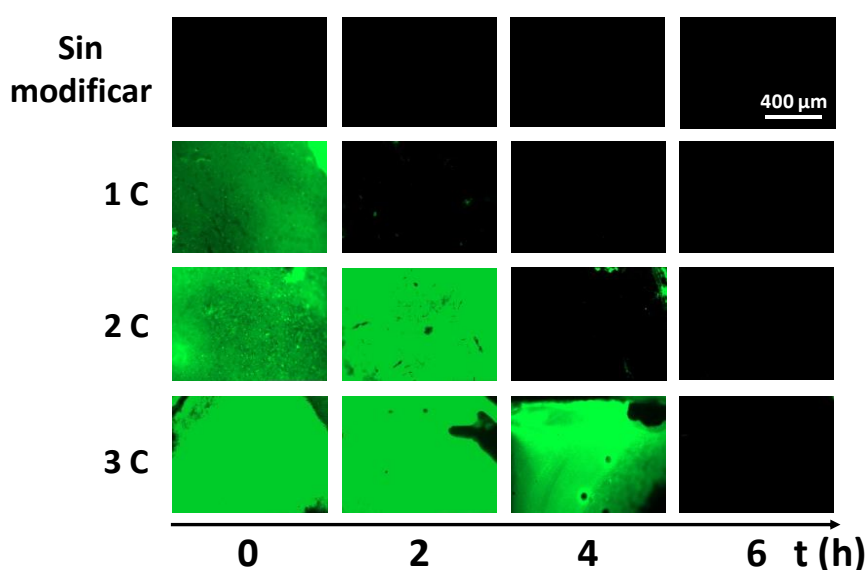


Fig. 4.77: Imágenes de fluorescencia obtenidas para WEs sin modificar o modificados secuencialmente con 1, 2 o 3 capas (C) a partir de una disolución precursora del polímero al 16 % suplementado con FITC en función del tiempo de incubación en PBS (0.1 M, pH 6.5).

Los resultados obtenidos empleando microscopía de fluorescencia fueron totalmente concordantes con los observados en CV.

También se llevó a cabo una estimación aproximada de la carga en masa de Eudragit L100 depositada sobre el electrodo para cada uno de los recubrimientos ensayados teniendo en cuenta su porcentaje, el número de capas depositadas (3 μ L/capa) y el área geométrica de los WEs (diámetro: 3.0 mm, área: 0.070686 cm²). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.26 y Fig 4.78.

Tabla 4.26. Estimación aproximada de la carga de masa del precursor (Eudragit L100) depositado sobre la superficie del electrodo en función del número de capas y el porcentaje del polímero en la disolución precursora empleado para el recubrimiento. Diámetro del electrodo de trabajo: 3 mm; volumen de la disolución de polímero empleado para la modificación de los WEs: 3 μL .

Eudragit L100		
Número de capas	% (p/v)	Carga de precursor, $\times 10^{-4} \text{ g cm}^{-2}$
1	4.0	17.0
	8.0	34.0
	16.0	67.9
2	16.0	135.8
3	16.0	203.7

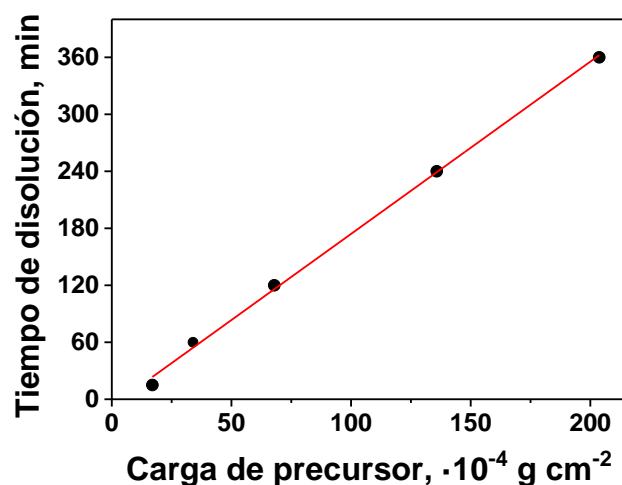


Fig. 4.78: Dependencia del tiempo de disolución del recubrimiento polimérico con base de metacrilato con la carga de masa del precursor (Eudragit L100) depositada sobre el WE, estimada en la Tabla 4.26.

Los resultados obtenidos (Fig 4.78) demuestran una dependencia lineal del tiempo de disolución del recubrimiento con la carga de precursor ($r = 0.999$), con una pendiente de $(1.8 \pm 0.1) \text{ min cm}^2 \text{ g}^{-1}$ y una ordenada en el origen de $(-7 \pm 15) \text{ min}$. Estos resultados indican, de nuevo, la posibilidad de controlar con precisión el tiempo de activación del

sensor para cada aplicación particular; mediante la modulación de su densidad o espesor.

Es importante destacar, además, que aunque todos los experimentos se han llevado a cabo a pH 6.5, según se describe en las especificaciones del producto comercial [Eudragit L100], la velocidad de disolución de los recubrimientos transitorios aumenta con el pH de la solución.

4.4.1.2. Características operacionales del recubrimiento protector

Para la caracterización operacional de la modificación de superficies sensoras con recubrimientos temporales, se evaluó la reproducibilidad del proceso de disolución con el tiempo de incubación en PBS (0.1 M, pH 6.5), comparando las intensidades de los picos de oxidación obtenidos mediante CV para el sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, empleando cuatro electrodos de carbono diferentes modificados de la misma manera con una capa de polímero a partir de una disolución precursora que contiene un 16 % de polímero. Los resultados obtenidos a los 0, 30, 60, 90 y 120 min de incubación, se muestran en la Fig. 4.79.

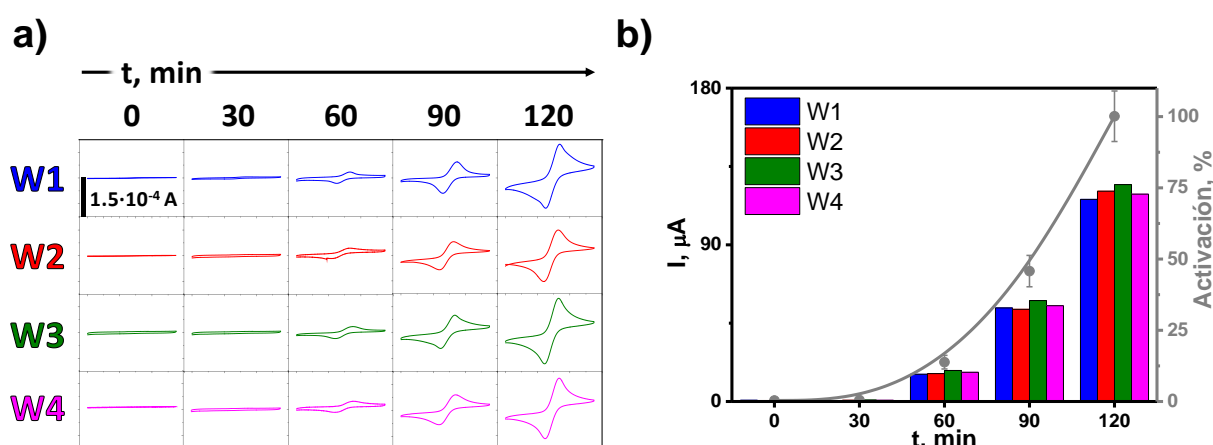


Fig. 4.79: Voltamperogramas cíclicos (a) e intensidades de oxidación (b) obtenidas a partir de cuatro electrodos de trabajo diferentes modificados de la misma manera con una capa de polímero a partir de una disolución precursora que contiene un 16 % de polímero, en función del tiempo de incubación en PBS (0.1 M, pH 6.5). CV: 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ en PBS (0.1 M, pH 6.5), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Los resultados obtenidos demuestran la ausencia de respuesta electroquímica y, por tanto, la no solubilización del recubrimiento para tiempos inferiores a 30 min. A partir de 60 min se observa una progresiva disolución del recubrimiento hasta los 120 min, donde se produce su total disolución, presentando, por tanto, la fase sensora al 100 % de actividad, obteniendo valores de $RSD_{(n=4)}$ de 5.8, 4.0 y 3.0 %, para tiempos de incubación de 60, 90 y 120 min, respectivamente, lo que indica que la solubilización de la membrana es reproducible con el tiempo de incubación. Esto permite concluir que el proceso de disolución controlada es fiable y, por tanto, se puede conocer *a priori* el tiempo de activación de la fase sensora para una densidad y espesor conocidos.

4.4.1.3. Evaluación del funcionamiento de los recubrimientos protectores en medios biológicos y/o complejos

Otro aspecto importante a estudiar es el potencial de los recubrimientos poliméricos temporales para la protección de superficies (bio)sensores de adsorciones indeseables durante su incubación en fluidos biológicos y/o complejos. Para ello, se compararon los voltamperogramas cíclicos y las intensidades de oxidación resultantes, obtenidas en presencia del par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, para electrodos de carbono sin modificar o modificados con una capa del polímero protector preparado a partir de una disolución precursora del polímero al 16.0 %, tras su incubación durante 0, 30, 60, 90 y 120 min en: Triton X-100 (5000 mg L⁻¹), gelatina de piel de vacuno (50 mg L⁻¹) (preparados en PBS 0.1 M pH 6.5) o suero humano sin diluir (pH \approx 6.5). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.80.

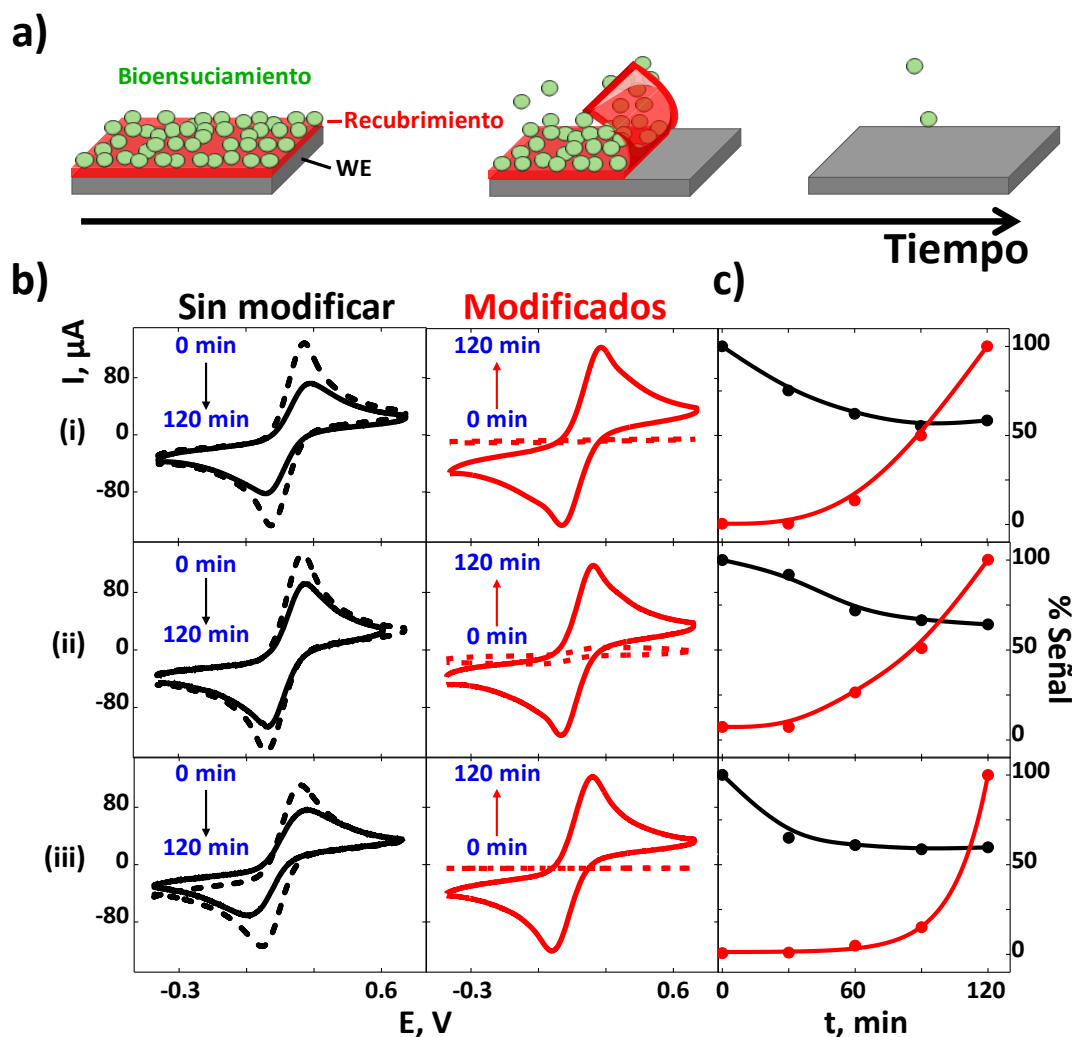


Fig. 4.80: a) Diagrama esquemático de las propiedades antiensuciamiento impartidas por los recubrimientos transitorios. b) Voltamperogramas cíclicos obtenidos para electrodos sin modificar (negro) y modificados con una capa a partir de una disolución precursora del polímero al 16.0 % (rojo) tras su incubación durante (0–120) min en 50 mg L⁻¹ de gelatina de piel de vacuno (i), 5000 mg L⁻¹ de Triton X-100 (ii) y suero humano sin diluir (iii). c) Comparación de las intensidades de oxidación resultantes, expresadas en porcentaje, con el tiempo. CV: 5 mM [Fe(CN)₆]^{4-/3-} en PBS (0.1 M, pH 6,5), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Los resultados obtenidos empleando electrodos de carbono sin modificar (Fig. 4.80, b y c, líneas negras) demuestran la disminución de las respuestas electroquímicas tras su incubación en las matrices complejas biológicas ensayadas, debido al ensuciamiento gradual de la superficie sensora por acumulación de las macromoléculas presentes en las mismas. Por el contrario, en los electrodos modificados con los recubrimientos temporales (Fig. 4.80, b y c, líneas rojas) se observa un aumento significativo de las intensidades de oxidación del voltamperograma, expresadas en

porcentaje, con el tiempo de incubación a partir de los 30 min, atribuible a la disolución progresiva de los polímeros protectores transcurrido este tiempo.

Estos resultados confirman las propiedades antiensuciamiento de los recubrimientos transitorios empleados en este trabajo. De acuerdo con los resultados obtenidos, estos recubrimientos protegen la superficie sensora durante su incubación en los medios biológicos y aseguran la máxima actividad de la superficie sensora (100 %) a los 120 min de incubación en Triton X-100, gelatina de piel de vacuno o suero humano, en comparación con las señales obtenidas de 64, 58 o 60 %, respectivamente, en estos mismos medios y al mismo tiempo de medida, con los electrodos sin modificar.

En este punto cabe destacar, que las interesantes capacidades que ofrecen los recubrimientos transitorios empleados para la activación retardada y protección antiensuciamiento de superficies sensoras electroquímicas, ponen de manifiesto su atractivo potencial para el desarrollo de novedosas plataformas multi(bio)sensoras para la monitorización secuencial de biomarcadores de interés, directamente en fluidos biológicos.

4.4.1.4. Desarrollo de plataformas biosensoras para su aplicación en entornos biológicos complejos

La aplicabilidad de los recubrimientos temporales también se exploró en el desarrollo de biosensores enzimáticos para la determinación de analitos de gran relevancia clínica, como la glucosa. Para ello, se empleó como modelo un biosensor enzimático de glucosa oxidasa (GOx) modificado con estos recubrimientos protectores.

Este biosensor enzimático electroquímico está basado en el empleo de electrodos de carbono-Azul de Prusia (PB), seleccionados por su elevada selectividad hacia el producto de la reacción enzimática (H_2O_2) y simplicidad de empleo, modificados con GOx.

En primer lugar, se compararon las respuestas cronoamperométricas obtenidas en ausencia y presencia de glucosa (3 mM) para biosensores sin modificar (W1) o modificados con 1 (W2), 2 (W3) o 3 capas (W4) de polímero empleando una disolución precursora del mismo al 16 %. Para realizar el experimento, se monitorizó la intensidad

de corriente obtenida con los biosensores desarrollados en presencia de glucosa cada 2 h, manteniéndolos incubados en PBS (0.1 M, pH 6.5). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.81.

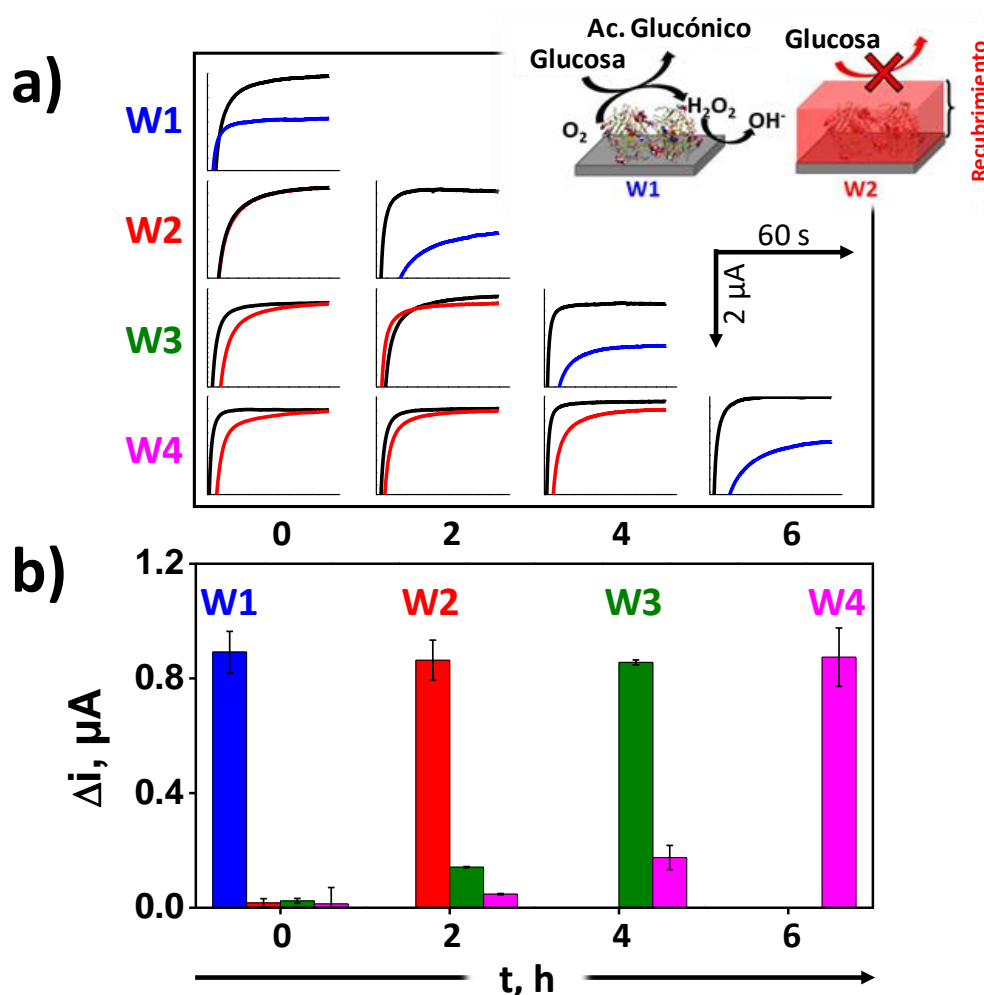


Fig. 4.81: a) Cronoamperogramas obtenidos en ausencia (curvas negras) y presencia de glucosa (3 mM) (azul: electrodo activado; rojo: electrodo desactivado) para los biosensores de glucosa (sin modificar (W1) o modificados con 1–3 capas de polímero empleando una disolución precursora del mismo al 16 % (W2–W4, respectivamente)) y b) variaciones de intensidad obtenidas en presencia de glucosa (3 mM). Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$). Inserto en a): diagrama esquemático del concepto de acoplamiento biosensor-recubrimiento temporal. $E_{app} = -0.2$ V (vs. Ag/AgCl), 60 s, en 0.1 M PBS pH 6.5.

Los resultados mostrados (Fig. 4.81) demuestran que sólo se obtienen respuestas cronoamperométricas significativas en presencia de glucosa, tras la disolución de los recubrimientos transitorios tras 2, 4 o 6 h de incubación en PBS (0.1 M, pH 6.5), dependiendo del número de capas de polímero depositadas. La obtención de respuestas

cronoamperométricas similares en presencia de glucosa, para biosensores sin modificar inicialmente o para biosensores modificados trascurridos estos tiempos (Fig. 4.81, b W1 vs. W2 (2 h), W3 (4 h) y W4 (6 h)), demuestra la posibilidad de acoplar los recubrimientos temporales a superficies biosensoras sin alterar su operatividad tras la disolución completa del recubrimiento. Además, se confirma nuevamente la posibilidad de controlar a voluntad el tiempo al que se efectúa la detección de glucosa mediante la variación de su densidad o espesor.

Finalmente, con el objetivo de evaluar la aplicabilidad real de la metodología desarrollada para el biosensado “in situ” en fluidos biológicos, se llevó a cabo la monitorización de glucosa en muestras de saliva humana cruda (pH \approx 8.0) y sangre (pH \approx 7.0), ambas sin diluir, cada 30 min, empleando biosensores de glucosa-PB sin modificar o modificados con una capa de polímero preparada a partir de una disolución precursora al 16.0 %. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.82.

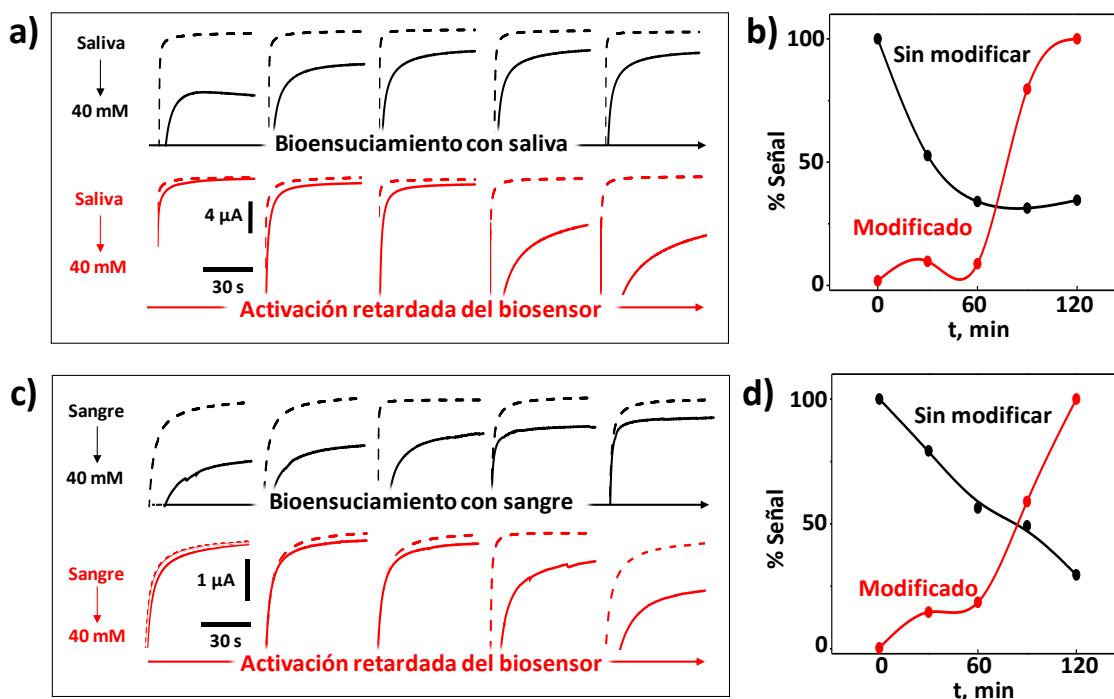


Fig. 4.82: Cronoamperogramas obtenidos tras la incubación prolongada de biosensores de glucosa-PB sin modificar (negro) o modificados con una capa de polímero preparada a partir de una disolución precursora al 16.0 % (rojo) en muestras de saliva humana (a) o sangre entera (c) sin diluir, antes (líneas punteadas) y después (líneas sólidas) de suplementarlas con 40 mM de glucosa para 0, 30, 60, 90, y 120 min de incubación (ordenados de izquierda a derecha, respectivamente) y señales relativas resultantes en presencia de glucosa, expresadas en porcentaje, en saliva (b) o sangre entera (d).

$$E_{app} = -0.2 \text{ V (vs. Ag/AgCl), 60 s.}$$

Los cronoamperogramas (Fig. 4.82, a y c) y señales relativas (Fig. 4.82, b y d), obtenidas en la monitorización de glucosa en saliva o sangre sin diluir, confirman de nuevo las excelentes propiedades antiensuciamiento impartidas por los recubrimientos temporales empleados, que permiten retrasar la actividad enzimática, manteniendo el 100 % de la respuesta inicial, tras 2 h de incubación en estos fluidos biológicos de elevada complejidad y viscosidad. En este punto es importante destacar, que en las mismas condiciones, los biosensores sin modificar habían perdido el 65.4 y 70.4 % de su respuesta inicial tras 2 h de incubación en saliva o sangre, respectivamente. Estos resultados demuestran el potencial de la metodología desarrollada para la monitorización “in situ” de biomarcadores de interés, como la glucosa, después de una exposición prolongada en fluidos biológicos complejos, sin alterar la operatividad de las plataformas biosensoras recién preparadas.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto, tanto el gran potencial de la metodología desarrollada para el diseño de dispositivos corporales de elevada estabilidad, con actividad retardada programable para la identificación de biomarcadores emergentes directamente en fluidos biológicos, como su versatilidad para empleo en otro tipo de plataformas, tanto electroquímicas (microagujas para monitorización mínimamente invasiva), como no electroquímicas. Esta atractiva tecnología puede encontrar también aplicación en otra amplia variedad de aplicaciones biomédicas, que incluyen dispositivos implantables, cápsulas ingeribles o microtransportadores de administración de fármacos gastrointestinales. Es de esperar que las características únicas de estos recubrimientos biocompatibles, sensibles al pH y que imparten excelentes propiedades anti-ensuciamiento por su disolución retardada, den lugar a una nueva generación de dispositivos multifuncionales capaces de hacer frente a desafíos no resueltos actualmente en multitud de aplicaciones de vanguardia.

4.4.2. Biosensor enzimático comestible acoplado a recubrimientos protectores poliméricos de activación controlada

En este apartado se discuten los resultados más relevantes del artículo: Ruiz-Valdepeñas Montiel et al. *Direct electrochemical biosensing in gastrointestinal fluids. Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 4597– 4604, resaltado como publicación de vanguardia por la revista, aportado como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

Las excelentes propiedades antiensuciamiento de los recubrimientos temporales, discutidas en el apartado 4.4.1, también se evaluaron para la activación controlada de biosensores electroquímicos enzimáticos comestibles (fabricados con productos alimentarios o ingeribles). Para ello, se desarrollaron biosensores de glucosa basados en la enzima GOx, modificados y sin modificar con los polímeros Eudragit L100 o E PO (que tienen una disolución/activación adecuada a $\text{pH} \geq 6.0$ o ≤ 5.0 , respectivamente), y se comprobó su funcionamiento en fluidos gastrointestinales de diferente pH y composición para el biosensado de glucosa por cronoamperometría.

Los fundamentos de la metodología desarrollada en este apartado se muestran en la Fig. 4.83. Para la fabricación de los biosensores comestibles, se emplearon materiales como el aceite de oliva y el carbón activo, que además de posibilitar la ingestión, protegen la actividad enzimática en medios fuertemente ácidos. También se procedió a modificar las superficies biosensoras con polímeros comerciales que se disuelven a diferente pH. Estos recubrimientos permiten el control temporal de la activación del biosensor en el fluido biológico de interés (ácido gástrico $\text{pH} \approx 1-5$ o intestinal $\text{pH} \approx 6.5$), asegurando la protección de la superficie biosensora de adsorciones indeseables durante su inactividad y la preservación de la actividad enzimática tras su incubación prolongada en estos medios con valores de pHs desnaturalizantes (Fig. 4.83).

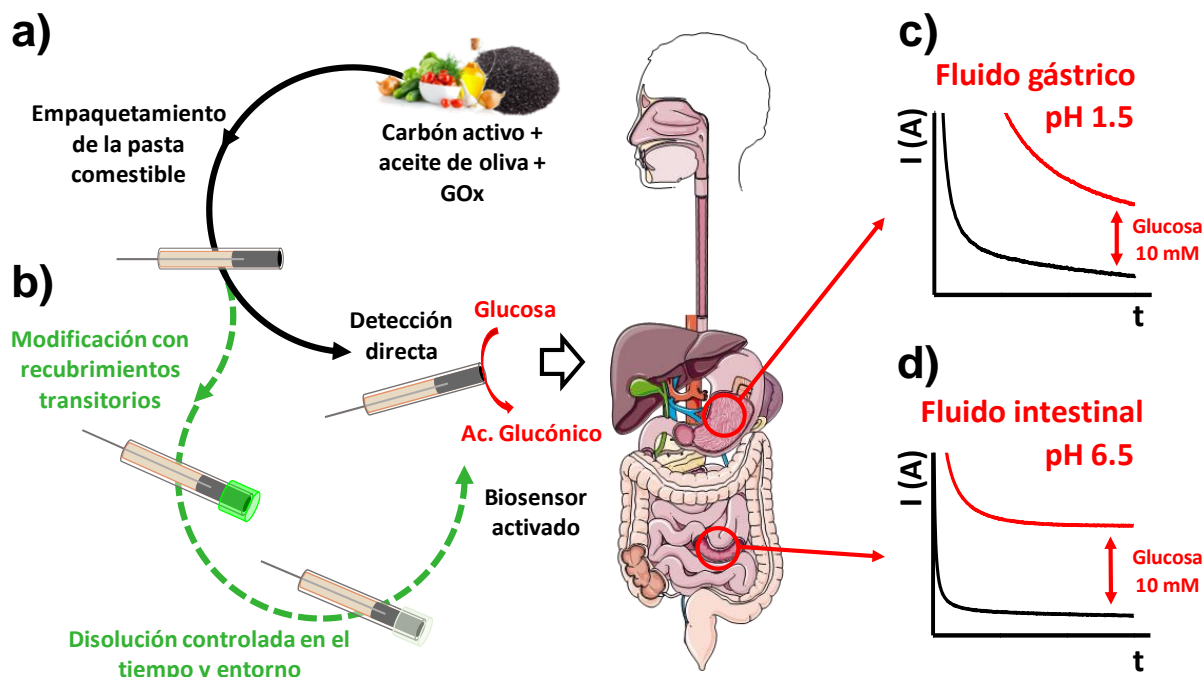


Fig. 4.83: Diagrama esquemático de las etapas de fabricación del biosensor comestible de glucosa (a) y modificación con los recubrimientos temporales para su disolución controlada en el tiempo y en función del pH (b). Cronoamperogramas obtenidos en la monitorización directa de glucosa en fluido gástrico (c) o intestinal (d). $E_{app} = +0.6$ V (vs. Ag/AgCl), 60 s.

4.4.2.1. Desarrollo de biosensores enzimáticos comestibles para biosensado en fluido gastrointestinal

El biosensor comestible desarrollado está basado en la metodología puesta a punto por el grupo de investigación dirigido por el Prof. Joseph Wang de la UCSD, que emplea pastas de carbono activo-aceites comestibles como base para el empaquetado de alimentos o de reactivos biocompatibles con actividad biocatalítica [Kim, 2017]. En nuestro caso, se empleó directamente la enzima GOx para la monitorización de glucosa.

En primer lugar, se evaluó la posibilidad de emplear estos biosensores enzimáticos comestibles sin modificar para la determinación directa de glucosa en fluidos gastrointestinales. Para ello, se compararon las respuestas cronoamperométricas de los biosensores comestibles en presencia de estándares de glucosa preparados en PBS (0.1 M, pH 7.4) o en soluciones simuladas del fluido intestinal (I) (pH 6.5) o gástrico (G) (pH 5.0 o 1.5). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.84.

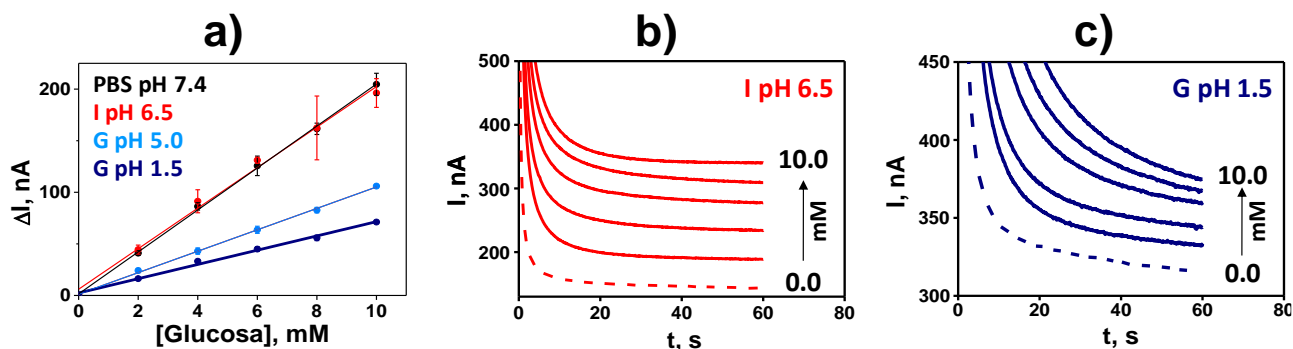


Fig. 4.84: a) Curvas de calibración construidas con los biosensores de glucosa para estándares de glucosa en PBS (0.1 M, pH 7.4) (negro), fluido intestinal (I) pH 6.5 (rojo) y fluido gástrico (G) pH 5.0 (azul claro) y pH 1.5 (azul oscuro). b) Cronoamperogramas obtenidos en I pH 6.5 (b) o G pH 1.5 (c) en ausencia (líneas punteadas) o presencia de estándares de glucosa (líneas sólidas) (2.0–10.0 mM). $E_{app} = +0.6$ V (vs. Ag/AgCl) durante 60 s. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Los resultados obtenidos demuestran una dependencia lineal de las respuestas cronoamperométricas con la concentración de estándares de glucosa en el intervalo de concentración comprendido entre (0.0–10.0) mM en todos los medios evaluados, con valores de pendiente similares en PBS ($(20.3 \pm 0.3) \text{ nA mM}^{-1}$ ($R^2 = 0.997$)) y fluido intestinal ($(19.6 \pm 0.8) \text{ nA mM}^{-1}$ ($R^2 = 0.994$)), sin pérdida aparente de sensibilidad por su empleo en este fluido complejo que simula el fluido intestinal (Fig. 4.84, a, líneas negras y rojas). Sin embargo, las sensibilidades obtenidas en fluido gástrico, a los dos valores de pH ensayados, eran significativamente inferiores, obteniéndose valores de pendientes de $(10.5 \pm 0.4) \text{ nA mM}^{-1}$ ($R^2 = 0.997$) y $(6.9 \pm 0.5) \text{ nA mM}^{-1}$ ($R^2 = 0.994$) para pH 5.0 y 1.5, respectivamente. Teniendo en cuenta el valor de pendiente similar obtenido en el fluido intestinal, las menores sensibilidades obtenidas en el fluido gástrico deben atribuirse más a la desactivación de la GOx a estos valores ácidos de pH que a un posible efecto matriz en estos medios [Mischak, 1985], [Wang, 2006-a]. Esta pérdida de actividad también se pone de manifiesto por el mayor tiempo que requieren para la estabilización de las respuestas cronoamperométrica en el fluido gástrico en comparación con fluido intestinal, 60 vs. 20 s, respectivamente, (fluido intestinal de pH 6.5, Fig. 4.84 (b) y gástrico de pH 1.5, Fig. 4.84 (c)).

Sin embargo, es importante destacar que los coeficientes de correlación obtenidos en las regresiones lineales para los diferentes fluidos evaluados, a los distintos pHs, indican que, aunque con una menor sensibilidad, es posible realizar la determinación de glucosa en los medios ensayados en el intervalo de concentraciones indicado.

También se evaluó la estabilidad de los biosensores comestibles para la determinación de glucosa tras su incubación prolongada en fluido intestinal (pH 6.5) y gástrico (pH 1.5). Los resultados obtenidos en el fluido gástrico se compararon con los proporcionados por plataformas biosensoras convencionales, basadas en la modificación de SPCEs con GOx empleando quitosano, y se muestran en la Fig. 4.85.

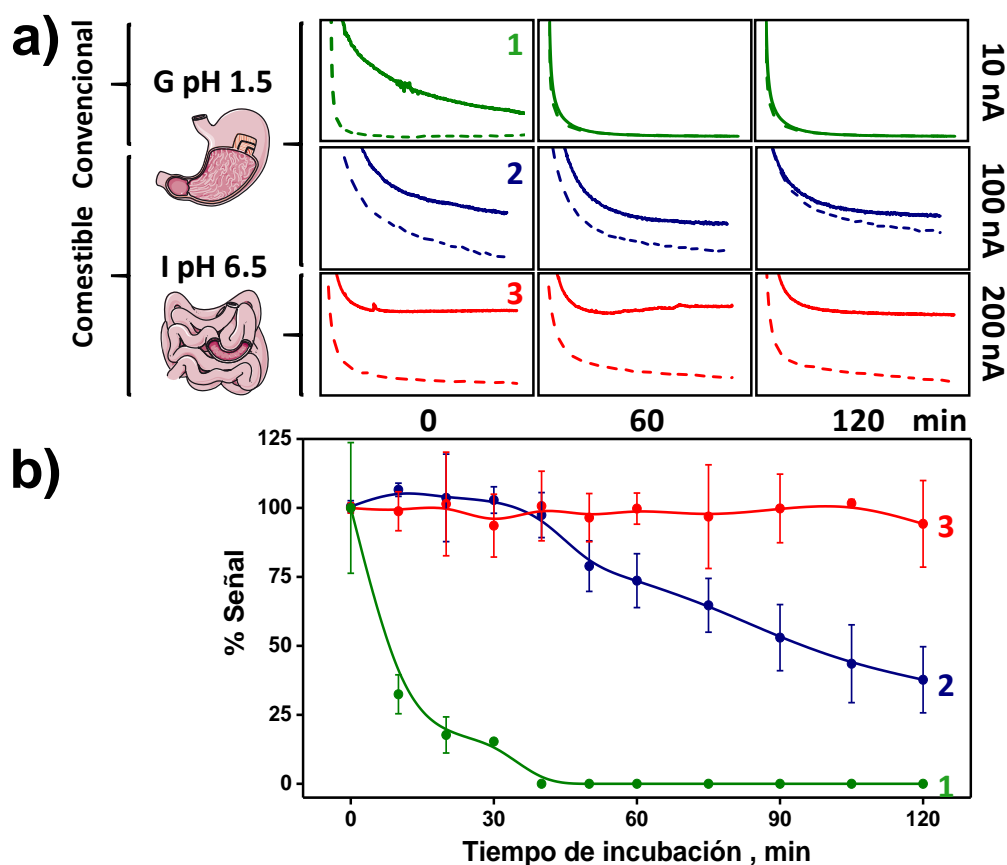


Fig. 4.85: a) Cronoamperogramas obtenidos en ausencia (líneas punteadas) o presencia de 5 mM de glucosa (líneas sólidas) tras diferentes tiempos de incubación (0, 60 y 120 min) y b) comparación de las señales cronoamperométricas obtenidas a distintos tiempos de incubación expresadas en porcentaje, con biosensores comestibles tras su incubación prolongada en fluido intestinal (I) pH 6.5 (rojo) y con biosensores convencionales o comestibles tras su incubación en fluido gástrico (G) pH 1.5 (verde y azul, respectivamente). $E_{app} = +0.6$ V (vs. Ag/AgCl) durante 60 s. Barras de error estimadas como tres veces la desviación estándar ($n = 3$).

Las medidas cronoamperométricas obtenidas (Fig. 4.85, a, curva 1 y 2 en verde y azul, respectivamente) demostraron una sensibilidad 19 veces superior empleando el biosensor comestible en comparación con el convencional (pendientes 6.9 vs. 0.37 nA nM⁻¹, respectivamente, obtenidas al instante de incubación en el fluido gástrico).

Es importante destacar la pérdida significativa de actividad biocatalítica del 68 % que se produce en el biosensor convencional (Fig. 4.85, a y b, curva 1 en verde) tras su incubación durante 10 min en fluido gástrico (pH 1.5) y que es completa para tiempos superiores a 30 min. Sin embargo, los resultados mostrados demuestran que los biosensores comestibles (Fig. 4.85, curva 2 y 3 en azul y rojo, respectivamente) ofrecían una elevada estabilidad para la determinación directa de glucosa en fluidos gastrointestinales tras su incubación en los mismos, reteniendo aproximadamente el 50 % de su actividad biocatalítica inicial después de 90 min en el fluido gástrico (pH 1.5) (Fig. 4.85, b, curva 2, en azul), y del 94 % después de 2 h de incubación en fluido intestinal (pH 6.5) (Fig. 4.85, b, curva 3, en rojo).

Este comportamiento de los biosensores comestibles para el análisis directo y tras su incubación en fluidos gastrointestinales, en condiciones de pH drásticas, pueden justificarse por la protección de la actividad biocatalítica de la GOx por la pasta comestible empleada, debido a la barrera que ofrece la matriz hidrofóbica en la que se encuentra atrapada la enzima (esencialmente por el empleo de aceite) [Wang, 2006-a] y que es permeable a la glucosa. Este comportamiento es similar al descrito en el atrapamiento de enzimas en matrices sol-gel modificadas con tensioactivos [Frenkel-Mullerad, 2005] o lipídicas [Gole, 2001].

4.4.2.2. Modificación de biosensores comestibles con recubrimientos poliméricos protectores para su disolución y activación controlada dependiente del tiempo y pH del medio de incubación

Aunque los resultados mostrados demuestran una estabilidad aceptable y significativamente mejorada, en comparación con los convencionales, de los biosensores comestibles para la determinación directa de glucosa en fluidos gastrointestinales simulados (libres de enzimas), para su aplicación real hay que tener en cuenta la necesidad de realizar las determinaciones tras prolongados tiempos de incubación y de prevenir el posible ensuciamiento con biomoléculas en fluidos reales, principalmente en el tracto digestivo, desde que se ingiere hasta que se activa.

Con el fin de proponer soluciones eficientes a estos retos, se evaluó el acoplamiento de los biosensores comestibles con los recubrimientos temporales, descritos en el apartado 4.4.1, con el fin de programar la disolución/activación de estos en el tiempo, minimizando los procesos de desnaturalización enzimática y de pasivación de la superficie electrodica.

Para ello, se llevó a cabo la modificación de la superficie activa de los biosensores comestibles con dos polímeros comerciales: Eudragit E PO o L100, que se disuelven a $\text{pHs} \leq 5.0$ o ≥ 6.0 , respectivamente, para su disolución en fluido gástrico (de pH comprendido entre 1.5–5) o intestinal (pH 6.5). Así, con el fin de evaluar la influencia de la densidad del recubrimiento polimérico depositado con el tiempo de disolución, se modificaron los biosensores comestibles a partir de disoluciones precursoras preparadas con diferentes porcentajes (2.0, 4.0 y 8.0 %) de estos polímeros comerciales y se caracterizó su comportamiento para la determinación de glucosa tras su incubación en fluido gástrico (pH 1.5) o intestinal (pH 6.5).

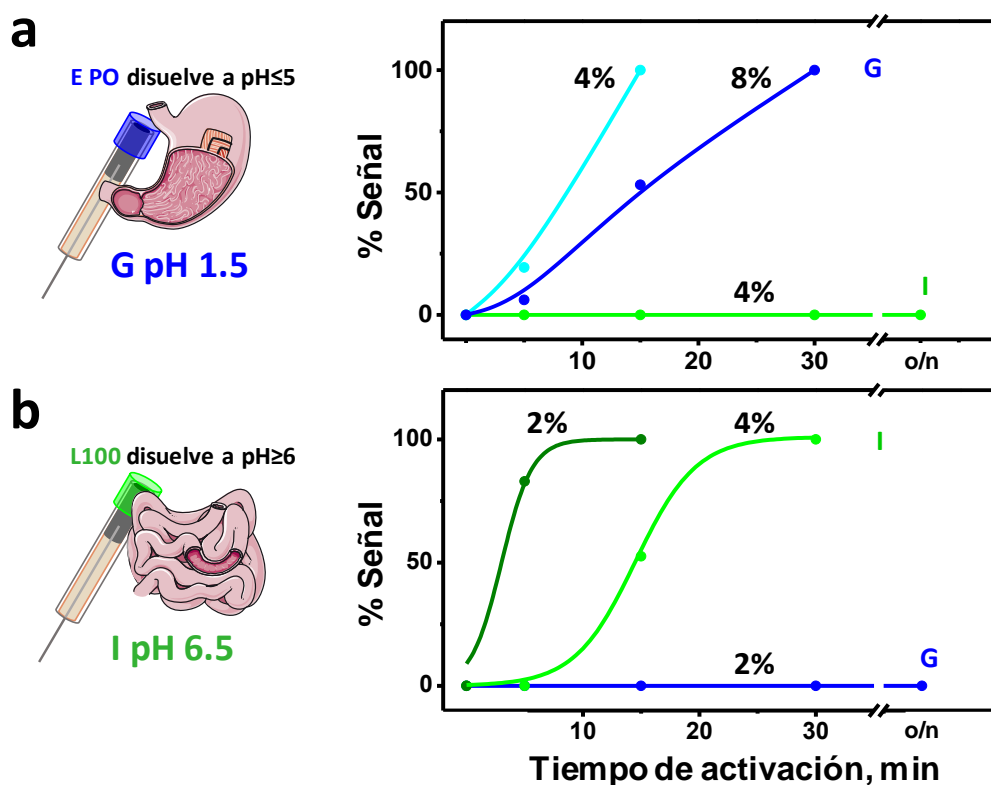


Fig. 4.86: Porcentaje de señal obtenida para 5 mM de glucosa con biosensores comestibles modificados a partir de disoluciones precursoras que contienen distintos porcentajes de los polímeros comerciales (2.0, 4.0 u 8.0 %): Eudragit E PO (a) o Eudragit L100 (b) incubados en fluido gástrico de pH 1.5 (G, líneas azules) o intestinal de pH 6.5 (I, líneas verdes). $E_{app} = +0.6$ V (vs. Ag/AgCl) durante 60 s.

Los resultados obtenidos demuestran, como era de esperar, la disolución del recubrimiento Eudragit E PO en fluido gástrico (pH 1.5) (Fig. 4.86, a, curvas cian y azul), pudiendo controlar el tiempo de disolución/activación en función de la densidad del recubrimiento depositado (15 vs. 30 min, empleando recubrimientos al 4.0 u 8.0 %, respectivamente). Sin embargo, el biosensor comestible Eudragit E PO, soluble a pH inferiores a 5.0, no mostró actividad (Fig. 4.86, a, curva verde) en fluido intestinal (pH 6.5) después de estar sumergido toda una noche.

De manera similar, los biosensores comestibles modificados con el polímero Eudragit L100 solo mostraron actividad tras su incubación durante tiempos determinados en fluido intestinal (pH 6.5), no observándose la disolución del recubrimiento tras su incubación durante una noche en fluido gástrico (pH 1.5) (Fig. 4.86, b, curva azul). De nuevo, los resultados obtenidos confirman las propiedades de estos recubrimientos temporales para el control del tiempo de disolución/activación, en función de la densidad del polímero depositado (aproximadamente 10 vs. 20 min,

cuando se emplean disoluciones precursoras que contienen 2.0 o 4.0 % de polímero, respectivamente). Estos resultados confirman, tanto la dependencia de la disolución efectiva del polímero con el pH del medio, como la posibilidad de control temporal de la activación de la plataforma biosensora.

Los resultados obtenidos demuestran la fabricación de biosensores electroquímicos comestibles de elevada estabilidad para la determinación sensible tras su incubación prolongada en fluidos gastrointestinales fuertemente ácidos, y su acoplamiento con recubrimientos temporales, para su activación en el punto de interés dependiente del pH del medio (elección del tipo de polímero a depositar) y en el momento deseado (densidad del recubrimiento polimérico depositado). En este punto, cabe destacar que el empleo de recubrimientos temporales permitiría, además de preservar la actividad catalítica de biomoléculas, proteger la superficie activa del biosensor de adsorciones inespecíficas.

Por otro lado, los resultados obtenidos demuestran que la combinación de pastas comestibles de carbono-aceite de oliva y recubrimientos temporales, proporcionan una doble protección y estabilización de las biomoléculas empleadas, siendo de gran relevancia para mejorar la eficiencia de tratamientos basados en la administración de enzimas activas al tracto gastrointestinal.

Además, dichas pastas podrían incorporar otros elementos alternativos, como tejidos y extractos de frutas o vegetales (por ejemplo, manzanas, plátanos, patatas, rábanos picantes y hongos) con actividad biocatalítica [Kim, 2017], o mediadores redox naturales (por ejemplo, 2-metoxi-1,4-naftoquinonas y constituyentes fenólicos) [Nittayanantaa, 2018], [Jeerapan, 2018-a], posibilitando la fabricación de biosensores comestibles con selectividad (operando a potenciales más bajos) y sensibilidad mejorada (acoplando actividades de GOx/HRP) [Wang, 2008], [Delvaux, 2005]. Estas capacidades permiten visionar la explotación futura de estas investigaciones en el desarrollo de cápsulas ingeribles que permitan el biosensado “in vivo” de analitos de relevancia, directamente en el tracto gastrointestinal [Jeerapan, 2018-b].

5. CONCLUSIONS

In this Ph.D. Thesis, novel electroanalytical platforms have been successfully implemented for the selective, accurate, reliable and reproducible determination of relevant food allergens or adulterants (both at genetic and functional level), through the development of easy-to-use and cost-effective bioelectroanalytical devices.

These smart design methodologies are based on the use of disposable screen-printed electrodes coupled to functionalized magnetic beads, as solid support to perform the bioassay, profiting the sensitivity and selectivity provided by the use of novel affinity biomolecules (proteins, antibodies or oligonucleotides), as capture or detector bioreceptors, for the determination of the target analyte with the sensitivity and selectivity required for each particular application. Besides, the versatility of all the developed platforms makes them perfectly transferable to the determination of other biomarkers candidates that can be identified in the food field or in other fields of interest.

Particularly, the research carried out during this Doctoral Thesis has led to the development of 8 amperometric immunosensors for the individual determination of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, ovomucoid, Ara h 1, Ara h 2 or bovine, ovine and caprine IgGs, and multiplexing immunoplatfroms: i) for the simultaneous determination of Ara h 1 and Ara h 2 and ii) for detection of adulterations with cow, sheep or goat milk and colostrum through multiplexed determination of the three animal-specific IgGs. Besides, an amperometric genosensor coupled to a reduced time-PCR amplification strategy for hazelnut detection and a PCR-free biosensing platform for horsemeat adulterations detection, through novel amplification strategies, based on the use of specific commercial antibodies and bacterial proteins conjugated with multiple HRP molecules.

These methodologies have been successfully employed in the analysis of real samples, directly or after a simple dilution, in milk or colostrum samples, protein or nucleic acid extracts and/or mitochondrial lysates resulting from food products of diverse nature and complexity, as well as in biological fluids such as saliva. These smartly designed electroanalytical devices have also allowed the simplification of the extraction procedures, commonly used in molecular biology, through magnetic biocaptors, demonstrating adequate analytical capabilities for determination of trace levels of allergenic proteins and foods, and for adulteration with cow's milk and horsemeat at the levels required by the European Legislation. In addition, these strategies have been compared advantageously with conventional methodologies employed for these type of

analysis, showing multiple advantages in terms of simplicity, cost, reduced assay time and portability of the required instrumentation, rendering them reliable and promising analytical tools for food safety and consumer protection. It is also important to note that the research carried out during this Doctoral Thesis has demonstrated in a pioneering way the possibility of developing nucleic acid biosensing strategies with tailored sensitivity within several orders of magnitude using neither nanomaterials nor nucleic acid amplification simply by varying the bioassay format, the length of the hybrid or the enzymatic labeling strategy.

Moreover, the research conducted during the predoctoral stay performed abroad has demonstrated the development of very simple strategies to impart (bio)sensors with demonstrated excellent performance to carry out determinations after prolonged incubations in complex biological media-rich in biomolecules or with pH values that negatively affect the biocatalytic activity of enzymes. These delayed response electrochemical (bio)sensors are based on the use of integrated formats modified with commercial biocompatible pH-sensitive and controlled-dissolution polymers, which are deposited on the (bio)sensor surface protecting it from undesirable adsorption/denaturing processes during incubation in biological and/or complex fluids. This novel strategy has been successfully employed to monitor relevant clinical analytes directly in serum, saliva and whole blood, employing multi-(bio)sensing screen-printed platforms, as well as in gastrointestinal fluids, with denaturing pH, using edible carbon paste-based enzymatic biosensors.

6. BIBLIOGRAFÍA

A

A

- [Abdelfatah, 2015]: E. N. Abdelfatah, I. E. El-Araby, A. A. R. Mohamed. *Glob. Vet.* 15 (3) (2015) 332–338.
- [Abeyrathne, 2013]: E. D. N. S. Abeyrathne, H. Y. Lee, D. U. Ahn. *Poult. Sci.* 92 (12) (2013) 3292–3299. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03391>.
- [Afzal, 2011]: A. Afzal, M.S. Mahmood, I. Hussain, M. Akhtar. *Pak. J. Nutr.* 10 (12) (2011) 1195–1202.
- [Ahammad, 2013]: A. J. Saleh Ahammad. *J. Biosens. Bioelectron.* S9:001 (2013) doi:10.4172/2155-6210.S9-001.
- [Ahmed, 2010]: M. U. Ahmed, Q. Hasan, M. M. Hossain, M. Saito, E. Tamiya. *Food Control* 21 (2010) 599–605.
- [Al-Ahmed, 2008]: N. Al-Ahmed, S. Alsowaidi, P. Vadas. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 4 (4) (2008) 139–143.
- [Alessandri, 2012]: S. Alessandri, A. Sancho, S. Vieths, C. E. N. Mills, J-M. Wal, P. R. Shewry, N. Rigby, K. Hoffmann-Sommergruber. *Plos One* 7 (2012) e39785. doi:10.1371/journal.pone.0039785.
- [Alhadrami, 2018]: H. A. Alhadrami. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 65 (2018) 497–508.
- [Ali, 2011]: M. E. Ali, U. Hashim, S. Mustafa, Y. B. Che Man, M. H. M. Yusop, M. Kashif, S. Th. Dhahi, M. F. Bari, M. A. Hakim, M. A. Latif. *J. Nanomater* 2011 (2011) 781098. doi:10.1155/2011/781098.
- [Ali, 2012-a]: M. E. Ali, U. Hashim, M. Kashif, S. Mustafa, Y. B. Che Man, S. B. Abd Hamid. *Genet. Mol. Res.* 11 (2) (2012) 1762–1772.
- [Ali, 2012-b]: M. E. Ali, S. Mustafa, U. Hashim, Y. B. Che Man, K. L. J. Foo. *J. Nanomater* 2012 (2012) 832387. doi:10.1155/2012/832387.
- [Ali, 2017]: J. Ali, J. Najeeb, M. A. Ali, M. F. Aslam, A. Raza. *J. Biosens. Bioelectron.* 8 (1) (2017) 235. doi:10.4172/2155-6210.1000235.
- [Altintas, 2013]: Z. Altintas, I. Tothill. *Sens. Actuators B Chem.* 188 (2013) 988–998.
- [Alves, 2015-a]: R. C. Alves, F. B. Pimentel, H. P. A. Nouws, R. C. B. Marqués, M. B. González-García, M. B. P. P. Oliveira, C. Delerue-Matos. *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 19–24.

- [Alves, 2015-b]: R. C. Alves, F. B. Pimentel, H. P. A. Nouws, W. Correr, M. B. González-García, M. B. P. P. Oliveira, C. Delerue-Matos. *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 7157–7163.
- [Amo, 2012]: A. Amo, R. Rodríguez-Pérez, J. Blanco, J. Villota, S. Juste, I. Moneo y M. L. Caballero. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 7453–7457.
- [Andrea, 2011]: M. D’Andrea, J. D. Coisson, M. Locatelli, C. Garino, E. Cereti, M. Arlorio. *Food Chem.* 124 (2011) 1164–1171.
- [Angulo, 2019]: A. Angulo, U. Eletxigerra, X. Lasheras, S. Campuzano, S. Merino. *Anal. Chim. Acta* 1079 (2019) 94–102.
- [Arduini, 2016]: F. Arduini, L. Micheli, D. Moscone, G. Palleschi, S. Piermarini, F. Ricci, G. Volpe. *Trends Analyt. Chem.* 79 (2016) 114–126.
- [Argüello, 2003]: A. Argüello, N. Castro, J. Capote, R. Ginés, F. Acosta, J. L. López. *Small Ruminant Res.* 48 (2003) 135–139.
- [Arlorio, 2007]: M. Arlorio, E. Cereti, J.D. Coisson, F. Travaglia, A. Martell. *Food Control* 18 (2007) 140–148.
- [Asensio, 2008]: L. Asensio, I. González, T. García, R. Martín. *Food Control* 19 (2008) 1–8.
- [Ashley, 2018]: J. Ashley, R. D’Aurelio, M. Piekarska, J. Temblay, M. Pleasants, L. Trinh, T. L. Rodgers, I. E. Tothill. *Biosensors* 8 (2) (2018) 32. doi:10.3390/bios8020032.
- [Ayudin, 2017]: E. B. Aydin, M. K. Sezgintürk. *Talanta* 172 (2017) 162–170.
- [Azüero, 2016]: A. M. V. Azüero y L. F. Gutiérrez. *CES Medicina Vet. y Zootecnia* 11 (2016) 3.

B

B

- [Bahadir, 2015]: E. B. Bahadir, M. K. Sezginturk. *Anal. Biochem.* 478 (2015) 107–120.
- [Bahadir, 2016]: E. B. Bahadir, M. K. Sezgintürk. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 44 (2016) 248–262.
- [Bai, 2009]: W. Bai, W. Xu, K. Huang, Y. Yuan, S. Cao, Y. Luo. *Food Control* 20 (2009) 366–370.
- [Bandodkar, 2015]: A. J. Bandodkar, W. Jia, C. Yardimci, X. Wang, J. Ramirez, J. Wang. *Anal. Chem.* 87 (2015) 394–398.
- [Barfidokht, 2014]: A. Barfidokht, J. J. Gooding. *Electroanalysis* 26 (2014) 1182–1196.

- [Bargen, 2014]: C. von Bargen, J. Brockmeyer, H. U. Humpf. *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 9428–9435.
- [Bartnikas, 2013]: L. M. Bartnikas, W. J. Sheehan, W. Phipatanakul. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 1 (2013) 354–360.
- [Belaunzaran, 2015]: X. Belaunzaran, R. J. B. Bessa, P. Lavín, A. R. Mantecón, J. K. G. Kramer, N. Aldai. *Meat Sci.* 108 (2015) 74–81.
- [Belitz, 2009]: H-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle (2009). *Química de los alimentos*. Acirbia, S.A (Ed.). Zaragoza, España.
- [Benedé, 2015]: S. Benedé, I. López-Expósito, E. Molina, R. López-Fandino. *Food Funct.* 6 (2015) 694–713.
- [Berti, 2009]: F. Berti, S. Laschi, I. Palchetti, J. S. Rossier, F. Reymond, M. Mascini, G. Marrazza. *Talanta* 77 (2009) 971–978.
- [Bernhisel-Broadbent, 1994]: J. Bernhisel-Broadbent, H. M. Dintzis, R. Z. Dintzis, R. Z. Dintzis, H. A. Sampson. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93 (6) (1994) 1047–1059.
- [Bettazzi, 2008]: F. Bettazzi, F. Lucarelli, I. Palchetti, F. Berti, G. Marrazza, M. Mascini. *Anal. Chim. Acta* 614 (2008) 93–102.
- [Billakanti, 2010]: J. M. Billakanti, C. J. Fee, F. R. Lane, A. S. Kash, R. Fredericks. *Int. Dairy J.* 20 (2010) 96–105.
- [Borková, 2005]: M. Borková, J. Snáselová. *Czech J. Food Sci.* 23 (2) (2005) 41–50.
- [Brandão, 2015]: D. Brandão, S. Liébana, S. Campoy, M. P. Cortés, S. Alegret, M. I. Pividori. *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 652–659.
- [Bublin, 2014]: M. Bublin, H. Breiteneder. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 14 (2014) 426. doi.org/10.1007/s11882-014-0426-8.

C

C

- [Cabanos, 2011]: C. Cabanos, H. Urabe, M. R. Tandang-Silvas, S. Utsumi, B. Mikami, N. Maruyama. *Mol. Immunol.* 49 (2011) 115–123.
- [Cadková, 2015]: M. Cadková, R. Metelka, L. Holubová, D. Horák, V. Dvůřáková, Z. Bílková, L. Korecká. *Anal. Biochem.* 484 (2015) 4–8.
- [Camacho, 2007]: C. Camacho, J. C. Matías, B. Chico, R. Cao, L. Gómez, B. K. Simpson, R. Villalonga. *Electroanalysis* 19 (2007) 2538–2542.

- [Campuzano, 2014]: S. Campuzano, R. M. Torrente-Rodríguez, E. López-Hernández, F. Conzuelo, R. Granados, J. M. Sánchez-Puelles, J. M. Pingarrón. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 6168–6171.
- [Campuzano, 2016]: S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente-Rodríguez, A. J. Reviejo, J. M. Pingarrón (2016). *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications*. Springer, Cham (Ed.). *Advanced Sciences and Technologies for Security Applications*. Nueva York, Estados Unidos. D. Nikolelis, G. P Nikoleli, Ltd.
- [Campuzano, 2017-a]: S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. *Chemosensors* 5 (1) (2017) 8. doi.org/10.3390/chemosensors5010008.
- [Campuzano, 2017-b]: S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. *Electrochim. Acta* 230 (2017) 271–278.
- [Campuzano, 2018]: S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. *Current Opinion in Electrochemistry* 12 (2018) 81–91.
- [Campuzano, 2019-a]: S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. *Current Opinion in Electrochemistry* 16 (2019) 35–41.
- [Campuzano, 2019-b]: S. Campuzano, M. Pedrero, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2) (2019) 423. doi.org/10.3390/ijms20020423.
- [Cao, 2011]: Q. Cao, H. Zhao, Y. Yang, Y. He, N. Ding, J. Wang, Z. Wu, K. Xiang, G. Wang. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 3469–3474.
- [Casal, 1998]: H. L. Casal, U. Köhler, H. H. Mantsch. *Biochim. Biophys. Acta* 957 (1998) 11–20.
- [Caubet, 2011]: J-C. Caubet, J. Wang. *Pediatr. Clin. North Am.* 58 (2011) 427–443.
- [Cetin, 2010]: M. Cetin, A. Atila, Y. Kadioglu. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 11 (2010) 1250–1256.
- [Chaumpluk, 2006]: P. Chaumpluk, M. Chikae, Y. Takamura, E. Tamiya. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 7 (2006) 263–269.
- [Chekin, 2016]: F. Chekin, S. K. Singh, A. Vasilescu, V. M. Dhavale, S. Kurungot, R. Boukherroub, S. Szunerits. *ACS sens.* 1 (2016) 1462–1470.
- [Chiavaioli, 2014]: F. Chiavaioli, C. Trono, A. Giannetti, M. Brenici, F. Baldini. *J. Biophotonics* 7 (5) (2014) 312–322.

- [Chiavaioli, 2015]: F. Chiavaioli, C. Trono, A. Giannetti, S. Tombelli, P. Biswas, S. Bandyopadhyay, S. Jana, S. Bera, A. Mallick, F. Baldini. *Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic and Surgical Guidance Systems XIII*, (2015) 93130R. doi:10.1117/12.2082809.
- [Chikkaveeraiah, 2012]: B. V. Chikkaveeraiah, A. Bhirde, N. Y. Morgan, H. S. Eden, X. Chen. *ACS Nano* 6 (2012) 6546–6561.
- [Chokshi, 2015]: N. Y. Chokshi, S. H. Sicherer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 15 (2015) 895–906.
- [Claeys, 2014]: W. L. Claeys, C. Verraes, S. Cardoen, J. De Block, A. Huyghebaert, K. Raes, K. Dewettinck, L. Herman. *Food Control* 42 (2014) 188–201.
- [Colak, 2016]: H. Colak, A. Aydin, B. Nazli, O. Ergun. *Food Control* 17 (2006) 905–908.
- [Comisión Europea]: European Commission. 2001 EC 213/2001 Methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. *Off. J. Eur. Comm.* 44 (2001) L37/31–L37/99.
- [Conesa, 2005]: C. Conesa, M. Lavilla, L. Sánchez, M. D. Pérez, L. Mata, P. Razquín, M. Calvo. *Eur. Food. Res. Technol.* 220 (2005) 222–225.
- [Conzuelo, 2012-a]: F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, D. G. Pinacho, A. J. Reviejo, M. P. Marco, J. M. Pingarrón. *Biosens. Bioelectron.* 36 (2012) 81–88.
- [Conzuelo, 2012-b]: F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, A. J. Reviejo, J. M. Pingarrón. *Anal. Chim. Acta* 737 (2012) 29–36.
- [Conzuelo, 2013]: F. Conzuelo, S. Campuzano, M. Gamella, D. G. Pinacho, A. J. Reviejo, M. P. Marco, J. M. Pingarrón. *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013) 100–105.
- [Conzuelo, 2014-a]: F. Conzuelo, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, M. Gamella, R. M. Torrente-Rodríguez, A. J. Reviejo, J. M. Pingarrón. *Anal. Chim. Acta* 820 (2014) 32–38.
- [Conzuelo, 2014-b]: F. Conzuelo (2014). Bioplataformas electroquímicas para la detección de antibióticos en leche. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- [Cooke, 1997]: S. K. Cooke, H. A. Sampson. *J. Immunol.* 159 (4) (1997) 2026–2032.
- [Cortina, 2006]: M. Cortina, M. J. Esplandiu, S. Alegret, M. del Valle. *Sens. Actuators B Chem.* 118 (2006) 84–89.

[Cox, 2015]: K. L. Cox, V. Devanarayan, A. Kriauciunas, J. Manetta, C. Montrose, S. Sittampalam. *Assay guidance manual* (2015) 250–253.

[Crespo, 2006]: J. F. Crespo, J. M. James, C. Fernández-Rodríguez, J. Rodríguez. *Br. J. Nut.* 96 (2) (2006) S95–S102.

[Cui, 2017]: M. Cui, Y. Wang, M. Jiao, S. Jayachandran, Y. Wu, X. Fan, X. Luo. *ACS Sens.* 2 (2017) 490–494.

[Cuillière, 1997]: M. L. Cuillière, M. Abbadi, C. Molé, P. Montagne, M. C. Béné. G. Faure. *J. Immunoassay* 18 (1997) 97–109.

D

D

[D'Andrea, 2011]: M. D'Andrea, J. D. Coisson, M. Locatelli, C. Garino, E. Cereti, M. Arlorio. *Food Chem.* 124 (2011) 1164–1171.

[Darwish, 2006]: I. A. Darwish. *Int. J. Biomed. Sci.* 2 (3) (2006) 217–235.

[Delaive, 2008]: E. Delaive, T. Arnould, M. Raes, P. Renard. *J. Immunol. Methods* 334 (2008) 51–58.

[De Luis, 2008]: R. De Luis, L. Mata, G. Estopañán, M. Lavilla, L. Sánchez, M. D. Pérez. *Food Agric. Immunol.* 19 (2008) 4874–4900.

[Delvaux, 2005]: M. Delvaux, A. Walcarius, S. Demoustier-Champagne. *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 1587–1594.

[De Silva, 2016]: C. De Silva, P. Dhanapala, T. Doran, M. L. K. Tang, C. Suphioglu. *Mol. Immunol.* 71 (2016) 152–160.

[Dhanapala, 2015]: P. Dhanapala, C. Silva, T. Doran, C. Suphioglu. *Mol. Immunol.* 66 (2015) 375–383.

[Dijk, 2000]: J. A. P. P. van Dijk, J. A. M. Smit. *J. Chromatogr. A* 867 (2000) 105–112.

[DIRECTIVA 2007/68/CE]: DIRECTIVA 2007/68/CE DE LA COMISIÓN de 27 de noviembre de 2007 que modifica el anexo III bis de la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que se refiere a determinados ingredientes alimentarios.

[Dooley, 2004]: J. J. Dooley, K. E. Paine, S. D. Garrett, H. M. Brown. *Meat Sci.* 68 (2004) 431–438.

[D'Orazio, 2003]: P. D'Orazio. *Clin. Chim. Acta* 334 (2003) 41–69.

[Drummond, 2003]: T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton. *Nat. Biotechnol.* 21 (10) (2003) 1192–1199.

[Duffy, 2017]: G. F. Duffy, E. J. Moore. *Anal. Lett.* 50 (1) (2017) 1–32.

E

E

[Eguílaz, 2010]: M. Eguílaz, M. Moreno-Guzmán, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 517–522.

[Eissa, 2012]: S. Eissa, C. Tlili, L. L. Hocine, M. Zourob. *Biosens. Bioelectron.* 38 (2012) 308–313.

[Eissa, 2013]: S. Eissa, L. L'Hocine, M. Siaj, M. Zourob. *Analyst* 138 (2013) 4378–4384.

[Elaine, 2016]: Elaine Ng, K. C. Nadeau, S. X. Wang. *Biosens. Bioelectron.* 80 (2016) 359–365.

[Eletxigerra, 2015]: U. Eletxigerra, J. Martinez-Perdiguero, S. Merino, R. Barderas, R. M. Torrente-Rodríguez, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, S. Campuzano. *Biosens. Bioelectron.* 70 (2015) 34–41.

[Eletxigerra, 2016-a]: U. Eletxigerra, J. Martínez-Perdiguero, S. Merino, R. Barderas, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, S. Campuzano. *Sens. Bionsens. Res.* 7 (2016) 71–76.

[Eletxigerra, 2016-b]: U. Eletxigerra, J. Martinez-Perdiguero, S. Merino, R. Barderas, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, S. Campuzano. *Electroanalysis* 28 (2016) 1787–1794.

[Ellis, 2015]: D. I. Ellis, H. Muhamadali, S. A. Haughey, C. T. Elliott, R. Goodacre. *Anal. Methods* 7 (2015) 9401–9414.

[Emaminejada, 2017]: S. Emaminejada, W. Gao, E. Wub, Z. A. Daviese, H. Y. Y. Nyein, S. Challa, S. P. Ryan, H. M. Fahad, K. Chen, Z. Shahpar, S. Talebi, C. Milla, A. Javey, R. W. Davis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114 (2017) 4625–4630.

[Emmenegger, 2009]: C. R. Emmenegger, E. Brynda, T. Riedel, Z. Sedlakova, M. Houska, A. B. Alles. *Langmuir* 25 (11) (2009) 6328–6333.

[Esteban-Fernández de Ávila, 2013]: B. Esteban-Fernández de Ávila, V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J. P. Salvador, M. P. Marco, J. M. Pingarrón. *Sens. Actuators B* 188 (2013) 212–220.

[Esteban-Fernández de Ávila, 2014]: B. Esteban-Fernández de Ávila, V. Escamilla-Gómez, V. Lanzone, S. Campuzano, M. Pedrero, D. Compagnone, J. M. Pingarrón. *Electroanalysis* 26 (2014) 254–261.

[Eudragit Evonic, p. web]: página web de Evonic. <https://healthcare.evonik.com/product/health-care/en/products/pharmaceutical-excipients/> (acceso 18-06-19).

[Eudragit L100]: Eudragit, Evonik Nutrition & Care GMBH, https://healthcare.evonik.com/product/health-care/Downloads/Evonik-Eudragit_brochure.pdf (acceso 05-06-19).

[Everstine, 2013]: K. Everstine, J. Spink, S. Kennedy. *J. Food Prot.* 76 (2013) 723–735.

F

F

[Falkheimer, 2015]: J. Falkheimer, M. Heide. *International Journal of Strategic Communication* 9 (2015) 134–147.

[Fang, 2017]: C. S. Fang, K-S. Kim, B. Yu, S. Jon, M-S. Kim, H. Yang. *Anal. Chem.* 89 (2017) 2024–2031.

[Fang, 2018]: C. S. Fang, K-S. Kim, D. T. Ha, M-S. Kim, H. Yang. *Anal. Chem.* 907 (2018) 4776–4782.

[Farrell, 2004]: H. M. Farrell, R. Jiménez-Flores, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Butler, L. K. Creamer, C. L. Hicks, C. M. Hollar, K. F. Ng-Kwai-Hang, H. E. Swaisgood. *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 1641–1674.

[Flanagan, 2015]: S. Flanagan (2015). *Handbook of Food Allergen: Detection and Control*. Elsevier (Ed.). Ámsterdam, Países Bajos. Simon Flanagan, Ltd.

[Flinterman, 2008]: A. E. Flinterman, J. H. Akkerdaas, C. F. den Hartog Jager, N. M. Rigby, M. Fernández-Rivas, M. O. Hoekstra, C. A. Bruijnzeel-Koomen, A. C. Knulst, R. van Ree, S. G. Pasmans. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121 (2008) 423–428.

[Frenkel-Mullerad, 2005]: H. Frenkel-Mullerad, D. Avnir. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (22) (2005) 8077–8081.

G

G

[Galán-Malo, 2014]: P. Galán-Malo, J. A. Valares, V. Langa, P. Razquin, L. Mata. *Small Rumin. Res.* 119 (2014) 156–160.

- [Galán-Malo, 2018]: P. Galán-Malo, I. Mendiara, P. Razquin, L. Mata. *Food Addit. Contam.* 35 (2018) 599–604.
- [Gamella, 2012]: M. Gamella, S. Campuzano, F. Conzuelo, A. J. Reviejo, J. M. Pingarrón. *Electroanalysis* 24 (2012) 2235–2243.
- [Gan, 2013]: S. D. Gan, K. R. Patel. *J. Invest. Dermatol.* 133 (2013) e12. doi:10.1038/jid.2013.287.
- [Gao, 2016]: W. Gao, S. Emaminejad, H. Y. Y. Nyein, S. Challa, K. Chen, A. Peck, H. M. Fahad, H. Ota, H. Shiraki, D. Kiriya, D. H. Lien, G. A. Brooks, R. W. Davis, A. Javey. *Nature* 529 (2016) 509–514.
- [Gapper, 2007]: L. W. Gapper, D. E. J. Copestake, D. E. Otter, H. E. Indyk. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 93–109.
- [Garranzo-Asensio, 2016]: M. Garranzo-Asensio, A. Guzman-Aranguez, C. Povés, M. J. Fernández-Aceñero, R. M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, G. Domínguez, L. San Frutos, N. Rodríguez, M. Villalba, J. M. Pingarrón, Susana Campuzano, R. Barderas. *Anal. Chem.* 88 (2016) 12339–12345.
- [Ghatak, 2015]: S. K. Ghatak, D. Majumdar, A. Singha, S. Sen, D. Das, A. Chakrabarti, C. Mukhopadhyay, K. Sen. *Food Chem.* 176 (2015) 308–313.
- [Giallo, 2005]: M. L. Giallo, F. Lucarelli, E. Cosulich, E. Pistarino, B. Santamaria, G. Marrazza, M. Mascini. *Anal. Chem.* 77 (2005) 6324–6330.
- [Giannetti, 2012]: A. Giannetti, S. Berneschi, F. Baldini, F. Cosi, G. N. Conti, S. Soria. *Sensors* 12 (2012) 14604–14611.
- [Godfray, 2010]: H. C. J. Godfray, J. R. Beddington, I. R. Crute, L. Haddad, D. Lawrence, J. F. Muir, J. Pretty, S. Robinson, S. M. Thomas, C. Toulmin. *Science* 327 (2010) 812–818.
- [Gole, 2001]: A. Gole, S. Vyas, S. R. Sainkar, A. Lachke, M. Sastry. *Langmuir* 17 (19) (2001) 5964–5970.
- [González-Álvarez, 2013]: M. J. González-Álvarez, E. Pérez-Ruiz, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, A. J. Miranda-Ordieres, M. J. Lobo-Castañón. *Electroanalysis* 25 (2013) 147–153.
- [Grieshaber, 2008]: D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult. *Sensors* 8 (2008) 1400–1458.

[Guan, 2004]: J-G. Guan, Y-Q. Miao, Q-J. Zhang. *J. Biosci. Bioeng.* 97 (4) (2004) 219–226.

[Guo, 2009]: F. Guo, M. H. Kothary, Y. Wang, X. Yu, A. J. Howard, T-J. Fuc, Y-Z. Zhang. *Acta Cryst.* F65 (2009) 42–46.

H

H

[Harley, 2016]: I. P. Hurley, R. C. Coleman, H. E. Ireland, J. H. H. Williams. *Int. Dairy J.* 16 (2006) 805–812.

[Hengel, 2007]: A. J. van Hengel. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 111–118.

[Herbel, 1987]: W. Herbel, A. Montag. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 185 (1987) 119–122.

[Hirschwehr, 1992]: R. Hirschwehr, R. Valenta, C. Ebner, F. Ferreira, W. R. Sperr, P. Valent, M. Rohac, H. Rumpold, O. Scheiner, D. Kraft. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90 (6) (1992) 927–936.

[Hochwallner, 2014]: H. Hochwallner, U. Schulmeister, I. Swoboda, S. Spitzauer, R. Valenta. *Methods* 66 (2014) 22–33.

[Hohensinner, 2007]: V. Hohensinner, I. Maier, F. Pittner. *J. Biotechnol.* 130 (2007) 385–388.

[Honma, 1991]: K. Honma, M. Aoyagi, K. Saito, T. Nishinuta, K. Sugirnoto, H. Tsunoo, H. Niimi, Y. Kohno. *Arerugi* 40 (1991) 1167–1175.

[Hourihane, 1995]: J. B. Hourihane, S. A. Kilburn, J. A. Nordlee, S. L. Hefle, S. L. Taylor, J. O. Warner. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100 (1997) 596–600.

[Huang, 2008]: Y. Huang, M. C. Bell, I. I. Suni. *Anal. Chem.* 80 (2008) 9157–9161.

[Hurley, 2004]: I. P. Hurley, R. C. Coleman, H. E. Ireland, J. H. H. Williams. *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 543–549.

[Hurley, 2006]: I. P. Hurley, R. C. Coleman, H. E. Ireland, J. H. H. Williams. *Int. Dairy J.* 16 (2006) 805–812.

[Hurley, 2011]: W. L. Hurley, P. K. Theil. *Nutrients* 3 (2011) 442–474.

I

I

[Imani, 2016]: S. Imani, A. J. Bandodkar, A. M. V. Mohan, R. Kumar, S. Yu, J. Wang, P. P. Mercier. *Nat. Commun.* 7 (2016) 11650. doi:10.1038/ncomms11650.

[Indyk, 2009]: H. E. Indyk. *Int. Dairy J.* 19 (2009) 36–42.

[Iniesto, 2013]: E. Iniesto, A. Jiménez, N. Prieto, B. Cabanillas, C. Burbano, M. M. Pedrosa, J. Rodríguez, M. Muzquiz, J. F. Crespo, C. Cuadrado, R. Linacero. *Food Chem.* 138 (2013) 1976–1981.

[Ishida, 1994]: N. Ishida, T. Hasegawa, K. Takeda, M. Sakagami, A. Onishi, S. Inumaru, M. Komatsu, H. Mukoyama. *Anim. Genet.* 25 (1994) 215–221.

J

J

[Jackson ImmunoResearch, P. Web]: <https://www.jacksonimmuno.com/secondary-antibody-resource/immuno-techniques/directandindirectwesternblotting/> (acceso 2-06-19).

[Jakes, 2015]: W. Jakes, A. Gerdova, M. Defernez, A. D. Watson, C. Mc. Callum, E. Limer, I. J. Colquhoun, D. C. Williamson, E. K. Kemsley. *Food Chem.* 175 (2015) 1–9.

[Jarvinen, 2007]: K. M. Jarvinen, K. Beyer, L. Vila, L. Bardina, M. Mishoe, H. A. Sampson. *Allergy* 62 (7) (2007) 758–765.

[Jeanson, 1999]: S. Jeanson, D. Dupont, N. Grattard, O. Rolet-Répécaud. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2249–2254.

[Jeerapan, 2016]: I. Jeerapan, J. R. Sempionatto, A. Pavinatto, J. M. You, J. Wang. *J. Mater. Chem. A Mater. Energy Sustain.* 4 (2016) 18342–18353.

[Jeerapan, 2018-a]: I. Jeerapan, B. Ciui, I. Martin, C. Cristea, R. Sandulescu, J. Wang. *J. Mater. Chem. B* 6 (2018) 3571–3578.

[Jeerapan, 2018-b]: I. Jeerapan, J. R. Sempionatto, J-M. You, J. Wang. *Biosens. Bioelectron.* 122 (2018) 284–289.

[Jin, 2011]: W. Jin, G. Yang, L. Wu, Q. Wang, H. Shao, A. Qin, B. Yu, D. Li, B. Cai. *Food Control* 22 (2011) 1609–1616.

[Johnson, 2014]: R. Johnson. Congressional Research Service 2014 (2014) [//fas.org/sgp/crs/misc/R43358.pdf](https://fas.org/sgp/crs/misc/R43358.pdf) (acceso 20-06-19).

[Jonas, 2001]: D. A. Jonas, I. Elmadfa, K-H. Engel, K. J. Heller, G. Kozianowski, A. König, D. Müller, J. F. Narbonne, W. Wackernagel, J. Kleiner. *Ann. Nutr. Metab.* 45 (2001) 235–254.

[Juliá, 2007]: S. Juliá, L. Sánchez, M. D. Pérez, M. Lavilla, C. Conesa, M. Calvo. *Food Res. Int.* 40 (2007) 603–612.

K

K

- [Kaçar, 2015]: C. Kaçar, R. M. Torrente-Rodríguez, M. Pedrero, S. Campuzano, E. Kilic, J. M. Pingarrón. *Microchim. Acta* 182 (2015) 1457–1464.
- [Kamizake, 2013]: N. K. K. Kamizake, M. M. Gonçalves, C. T. B. V. Zaia, D. A. M. Zaia. *J. Food Compost Anal.* 16 (2013) 507–516.
- [Kamau, 2010]: S. M. Kamau, S. C. Cheison, W. Chen, X-M. Liu, R-R. Lu. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9 (2010) 197–212.
- [Karyakin, 1999]: A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, L. Gorton. *Electrochemistry Communications* 1 (1999) 78–82.
- [Kehoe, 2014]: J. J. Kehoe, E. A. Foegeding. *Food Hydrocoll.* 39 (2014) 265–271.
- [Kesmen, 2009]: Z. Kesmen, A. Gulluce, F. Sahin, H. Yetim. *Meat Sci.* 82 (2009) 444–449.
- [Kim, 2015]: J. Kim, S. Imani, W. R. Araujo, J. Warchall, G. Valdés-Ramírez, T. R. L. C. Paixão, P. P. Mercier, J. Wang. *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 1061–1068.
- [Kim, 2017]: J. Kim, I. Jeerapan, B. Ciui, M. C. Hartel, A. Martin, J. Wang. *Adv. Healthcare Mater.* 6 (2017) 1700770. doi:10.1002/adhm.201700770.
- [Kim, 2018]: J. Kim, I. Jeerapan, J. R. Sempionatto, A. Barfidokht, R. K. Mishra, A. S. Campbell, L. J. Hubble, J. Wang. *Acc. Chem. Res.* 51 (2018) 2820–2828.
- [Kim, 2019]: J. Kim, A. S. Campbell, B. Esteban-Fernández de Ávila, J. Wang. *Nat. Biotechnol.* 37 (2019) 389–406.
- [King, 2017]: T. King, M. Cole, J. M. Farber, G. Eisenbrand, D. Zabaras, E. M. Fox, J. P. Hill. *Trends Food Sci. Technol.* 68 (2017) 160–175.
- [Kirsch, 2009]: S. Kirsch, S. Fourdrilis, R. Dobson, M-L. Scippo, G. Maghuin-Rogister, E. De Pauw. *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 57–67.
- [Koncki, 2007]: R. Koncki. *Anal. Chim. Acta* 599 (2007) 7–15.
- [Köppel, 2010]: R. Köppel, V. Dvorak, F. Zimmerli, A. Breitenmoser, A. Eugster, H. U. Waiblinger. *Eur. Food Res. Technol.* 230 (2010) 367–374.
- [Koppelman, 2001]: S. J. Koppelman, R. A. Vlooswijk, L. M. Knippels, M. Hessing, E. F. Knol, F. C. Van Reijssen, C. A. Bruijnzeel-Koomen. *Allergy* 56 (2001) 132–137.
- [Korhonen, 2000]: H. Korhonen, P. Marnila, H. S. Gill. *Br. J. Nut.* 84 (1) (2000) 75–80.

[Kovacs-Nolan, 2005]: J. K. N. Kovacs-Nolan, M. Phillips, Y. Mine. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 8421–8431.

[Kudr, 2018]: J. Kudr, B. Klejdus, V. Adam, O. Zitka. *Trends Anal. Chem.* 98 (2018) 104–113.

[Kukkonen, 2015]: A. K. Kukkonen, A. S. Pelkonen, S. Mäkinen-Kiljunen, H. Voutilainen, M. J. Mäkelä. *Allergy* 70 (2015) 1239–1245.

[Kummer, 1992]: A. Kummer, D. D. Kitts, E. Li-chan, J. N. Losso, B. J. Skura, S. Nakai. *Food Agric. Immunol.* 4 (1992) 93–102.

L

L

[Lassek, 1990]: E. Lassek, A. Montag. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 190 (1990) 17–21.

[Laube, 2011]: T. Laube, S. V. Kergaravat, S. N. Fabiano, S. R. Hernandez, S. Alegret, M. I. Pividori. *Biosens. Bioelectron.* 27 (2011) 46–52.

[Ledesma, 2002]: B. H. Ledesma. (2002). Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos. (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

[Leduc, 1999]: V. Leduc, C. Demeulemester, B. Polack, C. Guizard, L. Le Guern, G. Peltre. *Allergy* 54 (1999) 464–472.

[Lee, 2010]: J. Y. Lee, C. J. Kim. *J. AOAC Int.* 93 (2010) 462–477.

[Lee, 2016]: H. Lee, T. K. Choi, Y. B. Lee, H. R. Cho, R. Ghaffari, L. Wang, H. J. Choi, T. D. Chung, N. Lu, T. Hyeon, S. H. Choi, D-H. Kim. *Nat. Nanotechnol.* 11 (2016) 566–572.

[Lehmann, 2006]: K. Lehmann, K. Schweimer, G. Reese, S. Randow, M. Suhr, W-M. Becker, S. Vieths, P. Rösch. *Biochem. J.* 395 (2006) 463–472.

[Le Vallée, 2015]: J. Le Vallée, S. Charlebois. *J. Food Prot.* 78 (2015) 1896–1913.

[Levieux, 2002]: D. Levieux, F. Morgan, N. Geneix, I. Masle, F. Bouvier. *J. Dairy Res.* 69 (2002) 391–399.

[Li, 2012]: M. Li, Y-T. Li, D-W. Li, Y-T. Long. *Anal. Chim. Acta* 734 (2012) 31–44.

[Li, 2013]: H. Li, J. Yu, M. Ahmedna, I. Goktepe. *Food Chem.* 141 (2013) 762–768.

[Li-Chan]: E. Li-Chan, A. Kummer, J. N. Losso, D. D. Kitts, S. Nakai. *Food Res. Int.* 28 (1) (1995) 9–16.

- [Liébana, 2016]: S. Liébana, D. Brandao, P. Cortés, S. Campoy, S. Alegret, M. I. Pividori. *Anal. Chim. Acta* 904 (2016) 1–9.
- [Lim, 2016]: S. A. Lim, M. U. Ahmed. *Food Chem.* 206 (2016) 197–203.
- [Lipman, 2005]: N. S. Lipman, L. R. Jackson, L. J. Trudel, F. Weis-Garcia. *ILAR J.* 46 (3) (2005) 258–268.
- [Liu, 2007]: W-T. Liu, H. Guo, J-H. Wu. *Appl. Environ. Microb.* 73 (2007) 73–82.
- [Liu, 2010]: H. Liu, R. Malhotra, M. W. Peczu, J. F. Rusling. *Anal. Chem.* 82 (2010) 5865–5871.
- [Liu, 2014]: S. F. Liu, Y. Lin, T. Liu, C. B. Cheng, W. J. Wei, L. Wang, F. Li. *Biosens. Bioelectron.* 56 (2014) 12–18.
- [Liu, 2016]: X. Liu, S. Zheng, Y. Hu, Z. Li, F. Luo, Z. He. *Food Anal. Methods* 9 (2016) 2972–2978.
- [Loechel, 1998]: C. Loechel, G-C. Chemnitz, M. Borchardt, K. Cammann. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207 (1998) 381–385.
- [López, 2014]: M. S-P. López, G. F. Cabanillas, M. J. L. Castañón, B. López-Ruiz. *Biosens. Bioelectron.* 62 (2014) 350–356.
- [López-Calleja, 2013]: I. M. López-Calleja, S. de la Cruz, N. Pegels, I. González, T. García, R. Martín. *Food Control* 30 (2013) 480–490.
- [Lubin, 2009]: A. A. Lubin, B. V. S. Hunt, R. J. White, K. W. Plaxco. *Anal. Chem.* 81 (2009) 2150–2158.
- [Lucero, 2012]: Y. Lucero, I. Miquel, M. E. Arancibia. *Contacto Científico-Pediatría del Siglo XXI: Mirando al Futuro* (2016) 112–116.
- [Luis, 2009]: R. de Luis, M. Lavilla, L. Sánchez, M. Calvo, M. D. Pérez. *Food Control* 20 (2009) 643–647.
- [Luo, 2011]: A. Luo, A. Zhang, S. Y. W. Ho, W. Xu, Y. Zhang, W. Shi, S. L. Cameron, C. Zhu. *BMC Genomics* 12 (2011) 84. doi.org/10.1186/1471-2164-12-84.

M

M

- [MacPhee, 2010]: D. J. MacPhee. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 61 (2010) 171–177.
- [Mafra, 2008]: I. Mafra, I. M. P. L. V. O. Ferreira, M. B. P. P. Oliveira. *Eur. Food Res. Technol.* 227 (2008) 649–665.

- [Maleki, 2000]: S. J. Maleki, R. A. Kopper, D. S. Shin, C-W. Park, C. M. Compadre, H. Sampson, A. W. Burks, G. A. Bannon. *J. Immunol.* 164 (2000) 5844–5849.
- [Maloney, 2006]: J. M. Maloney, M. D. Chapman, S. H. Sicherer. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118 (2006) 719–724.
- [Mani, 2009]: V. Mani, B. V. Chikkaveeraiah, V. Patel, J. S. Gutkind, J. F. Rusling. *ACS Nano* 3 (2009) 585–594.
- [Mann, 2007]: K. Mann. *Proteomics* 7 (2007) 3558–3568.
- [Mannoor, 2012]: M. S. Mannoor, H. Tao, J. D. Clayton, A. Sengupta, D. L. Kaplan, R. R. Naik, N. Verma, F. G. Omenetto, M. C. McAlpine. *Nat. Commun.* 3 (2012) 763. doi:10.1038/ncomms1767.
- [Mars, 2018]: A. Mars, S. B. Jaafar, A. B. Ammar-El Gaied, N. Raouafi. *Microchim. Acta* 185 (2018) 449. doi.org/10.1007/s00604-018-2986-0.
- [Martín-Fernández, 2017]: B. Martín-Fernández, C. L. Manzanares-Palenzuela, M. S-P. López, N. S. Álvarez, B. López-Ruiz. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57 (13) (2017) 2758–2774.
- [Martorell, 2013]: A. Martorell, E. Alonso, J. Boné, L. Echeverría, M. C. López, F. Martín, S. Nevot, A. M. Plaza. *Allergol. Immunopathol.* 41 (2013) 320–336.
- [Mascini, 2005]: M. Mascinia, M. Carlo, M. Minunni, B. Chend, D. Compagnone. *Bioelectrochemistry* 67 (2005) 163–169.
- [Masthoff, 2013-a]: L. J. Masthoff, L. Mattsson, L. Zuidmeer-Jongejan, J. Lidholm, K. Andersson, J. H. Akkerdaas, S. A. Versteeg, C. Garino, Y. Meijer, P. Kentie, A. Versluis, C. F. den Hartog Jager, C. A. Bruijnzeel-Koomen, A. C. Knulst, R. van Ree, E. van Hoffen, S. G. Pasmans. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (2013) 393–399.
- [Masthoff, 2013-b]: L. Masthoff (2013). Hazelnut allergy in children and adults: diagnosis and underlying mechanisms. (Tesis Doctoral). Universidad de Utrecht. Países Bajos.
- [Matsuda, 1982]: T. Matsuda, K. Watanabe, R. Nakamura. *Biochim. Biophys. Acta* 707 (1982) 121–128.
- [Mayer, 2005]: H. K. Mayer. *Int. Dairy J.* 15 (2005) 595–604.
- [Mayeux, 2004]: R. Mayeux. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc.* 1 (2004) 182–188.

- [Mehraban, 2013]: M. H. Mehraban, R. Yousefi, A. Taheri-Kafrani, F. Panahi, A. Khalafi-Nezhad. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 112 (2013) 374–379.
- [Mehrvar, 2004]: M. Mehrvar, M. Abdi. *Anal. Sci.* 20 (2004) 1113–1126.
- [Meira, 2017]: L. Meira, J. Costa, C. Villa, F. Ramos, M. Beatriz, P. P. Oliveira, I. Mafra. *LWT - Food Science and Technology* 75 (2017) 408–416.
- [Miao, 2015]: P. Miao, Y. Tang, B. Wang, J. Yin, L. Ning. *Trends Analyt. Chem.* 67 (2015) 1–15.
- [Miranda-Castro, 2018]: R. Miranda-Castro, N. de los Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón. *Electroanalysis* 70 (2018) 1229–1240.
- [Mischak, 1985]: H. Mischak, C. P. Kubicek, M. Riihr. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21 (1985) 27–31.
- [Mittag, 2004]: D. Mittag, J. Akkerdaas, B. K. Ballmer-Weber. L. Vogel, M. Wensing, W. M. Becker, S. J. Koppelman, A. C. Knulst, A. Helbling, S. L. Hefle, R. Ree, S. Vieths. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114 (2004) 1410–1417.
- [Molinari, 2015]: J. Molinari, C. Moina, G. Ybarra. *J. Electrochem. Sci. Eng.* 5 (2015) 9–16.
- [Monaci, 2006]: L. Monaci, V. Tregoat, A. J. van Hengel, E. Anklam. *Eur. Food Res. Technol.* 223 (2006) 149–179.
- [Monaci, 2010]: L. Monaci, A. Visconti. *Trends Food Sci. Technol.* 21 (2010) 272–283.
- [Monaci, 2011]: L. Monaci, M. Brohée, V. Tregoat, A. V. Hengel. *Food Chem.* 127 (8) (2011) 669–675.
- [Mongra, 2012]: A. C. Mongra, A. Kaur. *Dig. J. Nanomater. Bios.* 7 (4) (2012) 1457–1471.
- [Monosika, 2012]: R. Monošika, M. Stred'anskyb, E. Šturdik. *Acta Chimica Slovaca* 5 (1) (2012) 109–120.
- [Mueller, 2011]: G. A. Mueller, R. A. Gosavi, A. Pomés, S. Wünschmann, A. F. Moon, R. E. London, L. C. Pedersen. *Allergy* 66 (2011) 878–885.
- [Munge, 2005]: B. Munge, G. Liu, G. Collins, J. Wang. *Anal. Chem.* 77 (2005) 4662–4666.
- [Munjel, 2017]: R. D. Munje, S. Muthukumar, B. Jagannath, S. Prasad. *Sci. Rep.* 7 (2017) 1950. doi:10.1038/s41598-017-02133-0.

[Muñoz-San Martín, 2019]: C. Muñoz-San Martín, M. Pedrero, F. J. Manuel de Villena, M. Garranzo-Asensio, N. Rodríguez, G. Domínguez, R. Barderas, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Electroanalysis* 31 (2019) 309–317.

N

N

[Navarro, 2018]: F. Navarro, P. Galan-Malo, M. D. Pérez, J. A. Abecia, L. Mata, M. Calvo, L. Sánchez. *Small Rumin. Res.* 168 (2018) 12–18.

[Negroni, 1998]: L. Negroni, H. Bernard, G. Clement, J. M. Chatel, P. Brune, Y. Frobert, J. M. Wal, J. Grassi. *J. Immunol. Methods* 220 (1998) 25–37.

[Nitride, 2013]: C. Nitride, G. Mamone, G. Picariello, C. Mills, R. Nocerino, R. Berni Canani, P. Ferranti. *J. Proteomics* 86 (2013) 16–26.

[Nittayanantaa, 2018]: W. Nittayanantaa, S. Limsuwan, T. Srichanad, C. Sae-Wongf, T. Amnuaikitt. *Arch. Oral Biol.* 90 (2018) 80–85.

O

O

[Owen, 2010]: G. R. H. Owen, L. Häkkinen, C. Wu, H. Larjava. *Microsc. Res. Tech.* 73 (6) (2010) 623–630.

P

P

[Palchetti, 2008]: I. Palchetti, M. Mascini. *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 455–471.

[Park, 2011]: Y. W. Park (2011). Goat milk: Composition, characteristics. Taylor & Francis Group (Ed.). Encyclopedia of Animal Science - (Two-Volume Set). Londres, Reino Unido. W. G. Pond, D. E. Ullrey, C. K. Baer, Ltd.

[Pastucha, 2019]: M. Pastucha, Z. Farka, K. Lacina, Z. Mikušová, P. Skládal. *Microchim. Acta* 186 (2019) 312. doi:10.1007/s00604-019-3410-0.

[Patel, 2016]: S. Patel, R. Nanda, S. Sahoo, E. Mohapatra. *Biochem. Res. Int.* 2016 (2016) 3130469. doi.org/10.1155/2016/3130469.

[Pedrero, 2011]: M. Pedrero, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Anal. Methods* 3 (2011) 780–789.

[Pedrero, 2012]: M. Pedrero, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Electroanalysis* 24 (3) (2012) 470–482.

- [Pedrero, 2016]: M. Pedrero, F. J. Manuel de Villena, C. Muñoz-San Martín, S. Campuzano, M. Garranzo-Asensio, R. Barderas, J. M. Pingarrón. *Biosensors* 6 (2016) 56. doi.org/10.3390/bios6040056.
- [Peláez-Lorenzo, 2009]: C. Peláez-Lorenzo, J. C. Díez-Masa, I. Vasallo, M. de Frutos. *Anal. Chim. Acta* 649 (2009) 202–210.
- [Pele, 2007]: M. Pele, M. Brohée, E. Anklam, A. Van Hengel. *Food Addit. Contam.* 24 (2007) 1334–1344.
- [Peng, 2013]: J. Peng, S. Song, L. Xu, W. Ma, L. Liu, H. Kuang, C. Xu. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10 (2013) 2897–2905.
- [Peng, 2015]: J. Peng, S. Song, L. Liu, H. Kuang, C. Xu. *Food Anal. Methods* 8 (2015) 2605–2611.
- [Pereira-Barros, 2019]: M. A. Pereira-Barros, M. F. Barroso, L. Martín-Pedraza, E. Vargas, S. Benedé, M. Villalba, J. M. Rocha, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Biosens. Bioelectron.* 137 (2019) 171–177.
- [Pilolli, 2013]: R. Pilolli, L. Monaci, A. Visconti. *Trends Analyt. Chem.* 47 (2013) 12–26.
- [Pinacho, 2014]: D. G. Pinacho, F. Sánchez-Baeza, M-I. Pividori, M-P. Marco. *Sensors* 14 (2014) 15965–15980.
- [Pollet, 2011]: J. Pollet, F. Delport, K. P. F. Janssen, D. T. Tran, J. Wouters, T. Verbiest, J. Lammertyn. *Talanta* 83 (2011) 1436–1441.
- [Pomés, 2003]: A. Pomés, R. M. Helm, G. A. Bannon, A. W. Burks, A. Tsay, M. D. Chapman. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111 (2003) 640–645.
- [Pomés, 2006]: A. Pomés, C. L. Butts, M. D. Chapman. *Clin. Exp. Allergy* 36 (2006) 824–830.
- [Poms, 2004]: R. E. Poms, C. L. Klein, E. Anklam. *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 1–31.
- [Povedano, 2018-a]: E. Povedano, E. Vargas, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente-Rodríguez, M. Pedrero, R. Barderas, P. San Segundo-Acosta, A. Peláez-García, M. Mendiola, D. Hardisson, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Sci. Rep.* 8 (2018) 6418. doi.org/10.1038/s41598-018-24902-1.
- [Povedano, 2018-b]: E. Povedano, A. Valverde, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, M. Pedrero, P. Yañez-Sedeño, R. Barderas, P. San Segundo-Acosta, A. Peláez-García, M. Mendiola, D. Hardisson, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57 (2018) 8194–8198.

[Premanandh, 2013]: J. Premanandh. *Food Control* 34 (2013) 568–569.

[Prodromidis, 2002]: M. I. Prodromidis, M. I. Karayannis. *Electroanalysis* 14 (4) (2002) 241–261.

[Puerta, 2005]: A. Puerta, J. C. Diez-Masa, M. de Frutos. *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 69–80.

Q

Q

[Qavi, 2011]: A. J. Qavi, J. T. Kindt, M. A. Gleeson, R. C. Bailey. *Anal. Chem.* 83 (2011) 5949–5956.

[Que, 2013]: X. Que, X. Chen, L. Fu, W. Lai, J. Zhuang, G. Chen, D. Tang. *J. Electroanal. Chem.* 704 (2013) 111–117.

R

R

[Ramos-Gómez, 2014]: S. Ramos-Gómez, M. D. Busto, M. Pérez-Mateos, N. Ortega. *Food Chem.* 158 (2014) 374–383.

[Raouafi, 2017]: A. Raouafi, A. Rabti, N. Raouafi. *Microchim. Acta* 184 (2017) 4351–4357.

[Redeker, 2013]: E. S. Redeker, D. T. Ta, D. Cortens, B. Billen, W. Guedens, P. Adriaenssens. *Bioconjugate Chem.* 24 (2013) 1761–1777.

[Ren, 2010]: Y. Ren, Z. Han, X. Chu, J. Zhang, Z. Cai, Y. Wu. *Anal. Chim. Acta* 667 (2010) 96–102.

[Reverté, 2016]: L. Reverté, B. Prieto-Simón, M. Campàs. *Anal. Chim. Acta* 908 (2016) 8–21.

[Ricci, 2007]: F. Ricci, G. Volpe, L. Micheli, G. Palleschi. *Anal. Chim. Acta* 605 (2007) 111–129.

[Ricci, 2012]: F. Ricci, G. Adornetto, G. Palleschi. *Electrochim. Acta* 84 (2012) 74–83.

[Rocchitta, 2016]: G. Rocchitta, A. Spanu, S. Babudieri, G. Latte, G. Madeddu, G. Galleri, S. Nuvoli, P. Bagella, M. I. Demartis, V. Fiore, R. Manetti, P. A. Serra. *Sensors* 16 (2016) 780. doi.org/10.3390/s16060780.

[Ronkainen, 2010]: N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, W. R. Heineman. *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1747–1763.

[Rossen, 1992]: L. Rossen, P. Norskov, K. Hoimstrom, O. F. Rasmussen. *Int. J. Food Microbiol.* 17 (1992) 37–45.

[Rotariu, 2016]: L. Rotariu, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault, C. Bala. *Trends Analyt. Chem.* 79 (2016) 80–87.

S

S

[Sakalar, 2012]: E. Şakalar, M. F. Abasiyanik. *Food Chem.* 130 (2012) 1050–1054.

[Sánchez, 2018]: J. G. R. Sánchez, S. P. Milla, B. P. Cortes, B. L. Plaza, L. M. B. López, C. Gómez-Candela. *Nutr. Hosp.* 35 (4) (2018) 102–108.

[Santos, 2013]: P. M. Santos, E. R. Pereira-Filho, L. E. Rodríguez-Saona. *Food Chem.* 138 (2013) 19–24.

[Sassolas, 2008]: A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier, L. J. Blum. *Chem. Rev.* 108 (2008) 109–139.

[Sathe, 2016]: K. S. Sathe, C. Liu, V. D. Zaffran. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 7 (2016) 191–220.

[Scaravelli, 2008]: E. Scaravelli, M. Brohee, R. Marchelli, A. Van Hengel. *Eur. Food Res. Technol.* 227 (2008) 857–869.

[Sempionatto, 2017]: J. R. Sempionatto; T. Nakagawa, A. Pavinatto, S. T. Mensah, S. Imani, P. Mercier, J. Wang. *Lab Chip* 17 (2017) 1834–1842.

[Senior, 2014]: M. Senior. *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 856. doi.org/10.1038/nbt0914-856.

[Serafin, 2017]: V. Serafin, R. M. Torrente-Rodríguez, M. Batlle, P. G. Frutos, S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón. *Microchim. Acta* 184 (2017) 4251–4258.

[Serpa, 2017]: P. B. S. Serpa, P. Garbade, C. C. Natalini, A. R. Pires, T. M. Tisotti. *Am. J. Vet. Res.* 78 (2017) 63–68.

[Sharma, 2016]: S. Sharma, H. Byrne, R. J. O’Kennedy. *Essays Biochem.* 60 (2016) 9–18.

[Sheikh, 2013]: S. Z. Sheikh; A. W. Burks. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 9 (6) (2013) 551–560.

[Shin, 1998]: D. S. Shin, C. M. Compadre, S. J. Maleki, R. A. Kopper, H. Sampson, S. K. Huang, A. W. Burks, G. A. Bannon. *J. Biol. Chem* 273 (1998) 13753–13759.

[Sicherer, 1998]: S. H. Sicherer, A. W. Burks, H. A. Sampson. *Pediatrics* 102 (1) (1998) 1–6.

- [Sicherer, 2006]: S. H. Sicherer, H. A. Sampson. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117 (2) (2006) S471–S475.
- [Simícková, 1987]: M. Simícková, B. A. Lang, K. Semotán, A. Kocent. *Clin. Chim. Acta* 163 (1987) 257–265.
- [Singh, 2010]: R. Singh, P. P. Sharma, R. E. Baltus, I. I. Suni. *Sens. Actuators B Chem.* 145 (2010) 98–103.
- [Souza-Silva, 2015]: E. A. Souza-Silva, R. Jiang, A. Rodriguez-Lafuente, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn. *Trends in Analyt. Chem.* 71 (2015) 224–235.
- [Stanciu, 2009]: L. Stanciu, Y-H. Won, M. Ganesana, S. Andreescu. *Sensors* 9 (2009) 2976–2999.
- [Stanciu, 2013]: S. Stanciu, N. Stanciuc, L. Dumitrascu, R. Ion, C. Nistor. *SEA-Practical Application of Science* 1 (2013) 174–181.
- [Stanciu, 2015]: S. Stanciu. *Procedia Economics and Finance* 23 (2015) 697–703.
- [Strimbu, 2010]: K. Strimbu, J. A. Tavel. *Curr. Opin. HIV AIDS* 5 (6) (2010) 463–466.
- [Sun, 2012]: X. Sun, L. Guan, X. Shan, Y. Zhang, Z. Li. *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 10979–10984.
- [Sun, 2015-a]: X. Sun, M. Jia, L. Guan, J. Ji, Y. Zhang, L. Tang, Z. Li. *Food Chem.* 172 (2015) 335–342.
- [Sun, 2015-b]: X. Sun, M. Jia, J. Ji, L. Guan, Y. Zhang, L. Tang, Z. Li. *Talanta* 131 (2015) 521–527.
- [Sun, 2018]: X. Sun, H. Wang, Y. Wang, T. Gui, K. Wang, C. Gao. *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 63–69.

T

T

- [Takagi, 2005]: K. Takagi, R. Teshima, H. Okunuki, S. Itoh, N. Kawasaki, T. Kawanishi, T. Hayakawa, Y. Kohnob, A. Urisu, J. Sawada. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 136 (2005) 23–32.
- [Tanabe, 2007]: S. Tanabe, M. Hase, T. Yano, M. Sato, T. Fujimura, H. Akiyama. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (12) (2007) 3131–3135.
- [Tang, 2011]: J. Tang, D. Tang, R. Niessner, G. Chen, D. Knopp. *Anal. Chem.* 83 (2011) 5407–5414.

- [Tavakoli, 2017]: J. Tavakoli, Y. Tang. *Polymers* 9 (2017) 364. doi:10.3390/polym9080364.
- [Taylor, 2002]: S. L. Taylor, S. L. Hefle, C. Bindslev-Jensen, S. A. Bock, A. W. Burks, L. L. Christie, D. J. Hill, A. Host, J. O'B. Hourihane, G. Lack, D. D. Metcalfe, D. A. Moneret-Vautrin, P. A. Vadas, F. Rance, D. J. Skrypec, T. A. Trautman, I. Malmheden Yman, R. S. Zeiger. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109 (2002) 24–30.
- [Tey, 2009]: D. Tey, R. G. Heine. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 9 (2009) 244–250.
- [Thakral, 2013]: S. Thakral, N. K. Thakral, D. K. Majumdar. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10 (1) (2013) 131–149.
- [Torrente-Rodríguez, 2014]: R. M. Torrente-Rodríguez, S. Campuzano, E. López-Hernández, R. Granados, J. M. Sánchez-Puelles, J. M. Pingarrón. *Electroanalysis* 26 (2014) 2080–2087.
- [Torrente-Rodríguez, 2015]: R. M. Torrente-Rodríguez, S. Campuzano, E. López-Hernández, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. Barderas, R. Granados, J. M. Sánchez-Puelles, J. M. Pingarrón. *Biosens. Bioelectron.* 66 (2015) 385–391.
- [Torrente-Rodríguez, 2016-a]: R. M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, M. Fachardo-Dinia, R. Barderas, P. San Segundo-Acosta, J. J. Montoya, J. M. Pingarrón. *ACS Sens.* 1 (2016) 896–903.
- [Torrente-Rodríguez, 2016-b]: R. M. Torrente-Rodríguez, S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, J. J. Montoya, J. M. Pingarrón. *Biosens. Bioelectron.* 86 (2016) 516–521.
- [Torrente-Rodríguez, 2016-c]: R. M. Torrente-Rodríguez, S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, A. Sagrera, J. J. Domínguez-Cañete, E. Vargas, J. J. Montoya, R. Granados, J. M. Sánchez-Puelles, J. M. Pingarrón. *JSM Biotechnol. Biomed. Eng.* 3 (4) (2016) 1064.
- [Torrente-Rodríguez, 2016-d]: R. M. Torrente-Rodríguez, S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, M. Pedrero, M. J. Fernández-Aceñero, R. Barderas, J. M. Pingarrón. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 288–293.
- [Torrente-Rodríguez, 2016-e]: R. M. Torrente-Rodríguez, S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, M. Gamella, J. M. Pingarrón. *Biosens. Bioelectron.* 77 (2016) 543–548.

[Torrente-Rodríguez, 2017]: R. M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, M. Pedrero, M. Farchado, E. Vargas, F. J. Manuel de Villena, M. Garranzo-Asensio, R. Barderas, J. M. Pingarrón. *Plos One* 12 (4) (2017) e0175056. doi.org/10.1371/journal.pone.0175056.

[Tran, 2013]: H. V. Tran, B. Piro, S. Reisberg, H. T. Duc, M. C. Pham. *Anal. Chem.* 85 (2013) 8469–8474.

V

V

[Valentini, 2009]: A. Valentini, F. Pompanon, P. Taberlet. *Trends Ecol. Evol.* 24 (2) (2009) 110–117.

[Valverde, 2018-a]: A. Valverde, E. Povedano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, P. Yáñez-Sedeño, M. Garranzo-Asensio, N. Rodríguez, G. Domínguez, R. Barderas, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Anal. Chem.* 90 (2018) 11161–11167.

[Valverde, 2018-b]: A. Valverde, E. Povedano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, P. Yáñez-Sedeño, M. Garranzo-Asensio, R. Barderas, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Biosens. Bioelectron.* 117 (2018) 766–772.

[Vargas, 2017]: E. Vargas, R. M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, M. Pedrero, J. J. Montoya, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 2151. doi.org/10.3390/ijms18112151.

[Vargas, 2018]: E. Vargas, E. Povedano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente-Rodríguez, M. Zouari, J. J. Montoya, N. Raouafi, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Sensors* 18 (2018) 863. doi.org/10.3390/s18030863.

[Vázquez-González, 2007]: M. Vázquez-González, R. M. Torrente-Rodríguez, A. Kozell, W. C. Liao, A. Cecconello, S. Campuzano, J. M. Pingarrón, I. Willner. *Nano Lett.* 17 (2017) 4958–4963.

[Vetrone, 2012]: S. A. Vetrone, M. C. Huarng, E. C. Alocilja. *Sensors* 12 (2019) 10487–10499.

W

W

[Wang, 1999]: J. Wang. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 47–53.

[Wang, 2002]: J. Wang. *Anal. Chim. Acta* 469 (2002) 63–71.

[Wang, 2003]: J. Wang. *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 247–257.

- [Wang, 2006-a]: J. Wang, M. Musameh, J-W. Mo. *Anal. Chem.* 78 (2006) 7044–7047.
- [Wang, 2006-b]: J. Wang. *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1887–1892.
- [Wang, 2008]: J. Wang. *Chem. Rev.* 108 (2008) 814–825.
- [Wang, 2015]: W. Wang, T. Kong, D. Zhang, J. Zhang, G. Cheng. *Anal. Chem.* 87 (2015) 10822–10829.
- [Wang, 2016]: X. Wang, W. Xu, P. Chatterjee, Lv. Cheng, J. Popovich, Z. Song, L. Dai, M. Y. S. Kalani, S. E. Haydel, H. Jiang. *Adv. Mater. Technol.* 1 (2016) 1600059. doi.org/10.1002/admt.201600059.
- [Wang, 2017]: G. Wang, R. Han, X. Sua, Y. Lia, G. Xua, X. Luo. *Biosens. Bioelectron.* 92 (2017) 396–401.
- [Warsinke, 2000]: A. Warsinke, A. Benkert, F. W. Scheller. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 622–634.
- [Watanabe, 2006]: T. Watanabe, H. Akiyama, S. Maleki, H. Yamakawa, K. Iijima, F. Yamazaki, T. Matsumoto, S. Futo, F. Arakawa, M. Watai, T. Maitani, *J. Food Biochem.* 30 (2006) 215–233.
- [Wei, 2009]: F. Wei, P. Patel, W. Liao, K. Chaudhry, L. Zhang, M. Arellano-Garcia, S. Hu, D. Elashoff, H. Zhou, S. Shukla, F. Shah, C-M. Ho, D. T. Wong. *Clin. Cancer Res.* 15 (13) (2009) 4446–4452.
- [Wei, 2012]: Q. Wei, Y. Zhao, B. Du, D. Wu, H. Li, M. Yang. *Food Chem.* 134 (2012) 1601–1606.
- [Wisniewski, 2000]: N. Wisniewski, F. Moussy, W. M. Reichert. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 611–621.
- [Wu, 2016]: X. Wu, Y. Li, B. Liu, Y. Feng, W. He, Z. Liu, L. Liu, Z. Wang, H. Huang. *Food Anal. Methods* 9 (2016) 582–588.

X

X

- [Xu, 2017]: W. Xu, H. Yang, W. Zeng, T. Houghton, X. Wang, R. Murthy, H. Kim, Y. Lin, M. Mignolet, H. Duan, H. Yu, M. Slepian, H. Jiang. *Adv. Mater. Technol.* 2 (2017) 1700181. doi.org/10.1002/admt.201700181.
- [Xue, 2019]: Y. Xue, D-L. Jiang, Q. Hu, S-Q Rao, L. Gao, Z-Q Yang. *Food Anal. Methods* 12 (2019) 1197–1207.

Y

Y

- [Yang, 2002]: Y. H. Yang, K. I. Kim, E. G. Cothran, A. R. Flannery. *Biochem. Genet.* 40 (5/6) (2002) 175–186.
- [Yanga, 2013]: X. Yanga, J. Kirscha, E. V. Olsen, J. W. Fergus, A. L. Simoniana. *Sens. Actuators B Chem.* 177 (2013) 659–667.
- [Yáñez-Sedeño, 2016]: P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Sensors* 16 (2016) 1585. doi:10.3390/s16101585.
- [Yáñez-Sedeño, 2018]: P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J.M. Pingarrón. *Sensors* 18 (2018) 675. doi:10.3390/s18020675.
- [Yáñez-Sedeño, 2019-a]: P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Chem. Commun.* 55 (2019) 2563. doi:10.1039/c8cc08815b.
- [Yáñez-Sedeño, 2019-b]: P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 19 (2019) 1–7.
- [Yáñez-Sedeño, 2019-c]: P. Yáñez-Sedeño, A. González-Cortés, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. *Sensors* 19 (2019) 2379. doi:10.3390/s19102379.
- [Yoshino, 2004]: K. Yoshino, K. Sakai, Y. Mizuha, A. Shimizuike, S. Yamamoto. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 55 (8) (2004) 635–640.

Z

Z

- [Zajac, 2014]: A. Zajac, J. Hanuza, L. Dymińska. *Food Chem.* 156 (2014) 333–338.
- [Zang, 2013]: S. Zang, Y. Liu, M. Lin, J. Kang, Y. Sun, H. Lei. *Electrochim. Acta* 90 (2013) 246–253.
- [Zhao, 2012]: X. Zhao, J. Chen, F. Du. *J. Food Sci. Technol.* 49 (5) (2012) 521–529.
- [Zhou, 2013]: Y. Zhou, J-S. Wang, X-J. Yang, D-H. Lin, Y-F. Gao, Y-J. Su, S. Yang, Y-J. Zhang, J-J. Zheng. *Int. J. Food Sci.* 2013 (2013) Article ID 909140. doi.org/10.1155/2013/909140.
- [Zouari, 2017]: M. Zouari, S. Campuzano, J. M. Pingarrón, N. Raouafi. *Biosens. Bioelectron.* 91 (2017) 40–45.
- [Zubeldia, 2012]: J. M. Zubeldia, I. Jáuregui, M. L. Baeza, C. J. Senent (2012). Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA. Nerea, S.A (Ed.). San Sebastián, España. J. J. R. Gardeazabal, Ltd.

Reglamento

[2014/180/UE]: Recomendación de la Comisión, de 27 de marzo de 2014, sobre un segundo plan coordinado de control para establecer la prevalencia de prácticas fraudulentas en la comercialización de determinados alimentos Texto pertinente a efectos del EEE. Diario Oficial de la Unión Europea, L 95/64; <https://www.boe.es/doue/2014/095/L00064-00068.pdf>.

[2018/150/UE]: Reglamento de ejecución (UE) 2018/150 de la comisión de 30 de enero de 2018 por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1240 en lo que se refiere a los métodos para el análisis y la evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos que pueden optar a la intervención pública y a la ayuda para el almacenamiento privado. http://noticias.juridicas.com/base_datos/Admin/613811-regl-2018-150-ue-de-30-ene-modificacion-del-regl-ue-2016-1240-respectco.html.

Reglamento

7. RESUMEN EN ESPAÑOL

Desarrollo de plataformas electroquímicas para biosensado directo de analitos de relevancia alimentaria y clínica en muestras de elevada complejidad

La evolución de la sociedad está generando nuevas inquietudes, como la garantía de la seguridad alimentaria y el acceso físico y económico a alimentos en cantidad suficiente, seguros y nutritivos. En este sentido, las enfermedades o trastornos asociados a la alimentación cobran cada día mayor importancia, como por ejemplo las alergias alimentarias, reacciones adversas a los alimentos producidas por un mecanismo inmunológico como consecuencia de la ingesta, contacto o inhalación de ciertas proteínas presentes en los alimentos, que pueden generar, incluso a niveles de traza, respuestas exacerbadas del sistema inmunológico. La alergia alimentaria afecta a alrededor del 5 % de la población adulta y al 80 % de la población infantil, presentando comúnmente sintomatologías locales (problemas digestivos, vómitos o dolor abdominal), sistemáticas (problemas cutáneos, respiratorios o cardiovasculares), e incluso severas, como el shock anafiláctico.

Otro de los problemas emergentes que debe afrontar la industria alimentaria son las prácticas fraudulentas que, con el objetivo principal de obtener ganancias económicas, socavan la confianza de los consumidores y pueden suponer un peligro para la salud. Entre los alimentos más comúnmente adulterados se incluyen: café, leche, té, pescado, miel, cereales, vino, especias y muestras cárnicas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral reside en el desarrollo de plataformas electroquímicas para biosensado fiable de analitos de relevancia alimentaria y clínica en muestras de elevada complejidad escasamente tratadas. Para lograrlo, se han seleccionado dos estrategias fundamentales: 1) basadas en el empleo de micropartículas magnéticas (MBs) como soportes sólidos para la fabricación de biosensores de afinidad para la determinación de biomarcadores de seguridad alimentaria, y 2) basadas en formatos integrados modificados empleando recubrimientos poliméricos temporales para la protección de superficies (bio)sensoras durante su incubación en medios biológicos ricos en biomoléculas y/o con valores de pH desnaturalizantes.

En primer lugar, se han empleado MBs para el desarrollo de inmuno- o genosensores amperométricos para la detección de los principales alérgenos que afectan a la población infantil, presentes en la leche de vaca y huevo, y aquellos que generan las respuestas alérgicas más severas, como el cacahuete y avellana, además de alguna de las adulteraciones más significativas, como la adulteración de productos lácteos con leche o calostro del mismo o distinto origen animal, y la presencia de carne de caballo en muestras cárnicas. En concreto, durante esta Tesis Doctoral, se han desarrollado, caracterizado y aplicado las siguientes bioplataformas electroquímicas:

1. cinco inmunosensores amperométricos, basados en el empleo de MBs funcionalizadas con grupos carboxílicos (HOOC-MBs) y anticuerpos específicos para la determinación individual de las proteínas alergénicas de la leche (β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina), del cacahuete (Ara h 1 y Ara h 2) y del huevo (ovomucoide), todas empleando formatos tipo sándwich;
2. una plataforma inmunosensora amperométrica dual para la determinación simultánea de las proteínas alergénicas del cacahuete (Ara h 1 y Ara h 2), empleando electrodos serigrafiados de carbono duales;
3. plataformas inmunosensoras amperométricas basadas en el empleo de HOOC-MBs y anticuerpos específicos para la determinación individual o múltiple de IgGs bovinas, ovinas y caprinas, como biomarcadores para la detección de adulteración en productos lácteos sobre plataformas de detección individuales o como método de cribado para la identificación del origen animal y de adulteraciones en productos lácteos con leche o calostro del mismo o distinto origen animal, empleando plataformas para 4 detecciones simultáneas;
4. un genosensor amperométrico acoplado a estrategias de amplificación por PCR de tiempo reducido para la identificación de la presencia de avellana, a través de la detección de un fragmento del gen que codifica la proteína alergénica Cor a 9; y
5. un biosensor amperométrico, con prestaciones analíticas mejoradas en términos de sensibilidad, para la detección de un fragmento característico de la región *D-Loop* del ADN mitocondrial del caballo, como biomarcador de adulteración, basado en el empleo de MBs funcionalizadas con estreptavidina, sondas sintéticas de ARN biotiniladas, anticuerpos específicos a heterohíbridos de ADN/ARN y

bioconjugados comerciales con múltiples moléculas de HRP, como método de amplificación.

Todas las plataformas desarrolladas han demostrado aplicabilidad exitosa para la determinación directa de los marcadores diana seleccionados en muestras de diferente naturaleza y complejidad: leche o calostro, extractos proteicos o genéticos, lisados mitocondriales crudos o saliva humana. En este punto, es importante destacar que en esta Tesis Doctoral se han propuesto las primeras plataformas electroanalíticas para la determinación de α -lactoalbúmina, Ara h 2, ovomucoide e IgGs bovinas, ovinas y caprinas y para la identificación de adulteraciones con carne de caballo. Se ha demostrado la determinación de cacahuete (a través de la detección individual, dual o total de Ara h 1 y Ara h 2) y de huevo (a través de la detección de OM) a niveles de traza, en productos alimentarios complejos y/o procesados. Además, el empleo de MBs acoplados a electrodos impresos en la fabricación de estos biosensores, ha permitido simplificar y reducir los tiempos de ensayo de los protocolos comúnmente empleados en biología molecular, para el aislamiento y determinación de marcadores proteicos y genéticos, sin necesidad de emplear instrumentación compleja, y proponiendo estrategias competitivas y compatibles con su empleo en el punto de atención. Todo ello ha contribuido a la publicación de distintos artículos de investigación y divulgación científica, y de dos Patentes.

Por otro lado, durante la estancia internacional de 6 meses realizada en la Universidad de California San Diego y supervisada por el Prof. Joseph Wang, se han desarrollado (bio)sensores electroquímicos de respuesta retardada que han demostrado excelentes propiedades para el biosensado electroquímico tras una incubación prolongada en medios biológicos complejos y/o desnaturalizantes. Estas estrategias se basan en el uso de formatos integrados modificados con polímeros biocompatibles comerciales sensibles al pH y de disolución controlada, que se depositan en la superficie del (bio)sensor protegiéndolo de procesos de adsorción indeseables durante su incubación en fluidos biológicos y/o complejos, o con valores de pH desnaturalizantes. La aplicabilidad de las metodologías desarrolladas ha quedado demostrada con la implementación de una plataforma multisensora con capacidad de activación retardada (6 h) y secuencial (cada 2 h) para la monitorización de glucosa. Además, las excelentes características antiensuciamiento que imparten estos recubrimientos se han aprovechado para la monitorización de glucosa en fluidos biológicos y/o complejos, utilizando

biosensores enzimáticos serigrafiados, que conservan el 100 % de la respuesta inicial después de 2 h de incubación en muestras de saliva humana o sangre entera sin diluir y en fluidos gastrointestinales, con valores de pH desnaturalizantes, utilizando biosensores enzimáticos fabricados con pastas de carbono comestibles.

8. RESUMEN EN INGLÉS

Development of electrochemical platforms for direct biosensing of analytes of food and clinical relevance in high-complexity samples

The evolution of society is raising new concerns, such as ensuring food security and physical and economic access to sufficient, secure and nutritional food. In this sense, illnesses or disorders associated with food are becoming increasingly important, such as food allergies, a type of adverse reaction to food produced by an immune mechanism as a consequence of the intake, contact or inhalation of certain proteins present in food, which can produce exacerbated immune system responses, even at trace levels. Food allergy affects around 5 % of the adult population and 80 % of the infant population, commonly showing local symptoms (digestive problems, vomiting or abdominal pain), systematic symptoms (skin, respiratory or cardiovascular problems), and severe symptoms such as anaphylactic shock.

Fraudulent practices, carried out for economic profit and which undermine consumer confidence and may present a health hazard, are another emerging problem in the food industry. Some of the most commonly adulterated foods include coffee, milk, tea, fish, honey, cereals, wine, spices or meat samples.

The principal aim of this PhD Thesis is the development of electrochemical platforms for reliable biosensing of analytes of food and clinical relevance in highly-complex samples scarcely treated. For this purpose, two fundamental strategies have been followed: 1) based on the use of magnetic beads (MBs) as microcarriers, for the fabrication of affinity biosensors, for the determination of food safety biomarkers, and 2) based on integrated formats modified with transient polymeric coatings, for the protection of (bio)sensing surfaces during incubation in highly-complex biological media and/or denaturing pH values.

Firstly, MBs have been used for the development of amperometric immuno- or genosensors for the detection of the main allergens affecting the infant population, present in cow's milk and egg, and those that generate the most severe allergic responses, such as peanut and hazelnut, as well as some of the most significant adulterations, such as dairy product adulteration with milk or colostrum of the same or different animal origin, and the presence of horsemeat in meat samples. Particularly,

during this Doctoral Thesis, the following electrochemical bioplatfroms have been developed, characterized and applied:

1. five amperometric immunosensors, based on the use of carboxylic-modified MBs (HOOC-MBs) and specific antibodies for the individual determination of milk (β -lactoglobulin and α -lactalbumin), peanut (Ara h 1 and Ara h 2) and egg (ovomucoid) allergenic proteins, all implemented in sandwich formats;
2. an amperometric dual immunosensing platform for the simultaneous determination of peanut allergenic proteins (Ara h 1 and Ara h 2) at dual screen-printed carbon electrodes;
3. amperometric immunosensing platforms based on the use of HOOC-MBs and specific antibodies for the individual or multiple determination of bovine, ovine and caprine IgGs, as biomarkers for the detection of adulteration in dairy products on individual detection platforms or as a screening method for the identification of animal origin and adulterations in dairy products with milk or colostrum from the same or different animal origin, using platforms for 4 simultaneous detections;
4. an amperometric genosensor coupled to reduced assay time-PCR amplification strategies for the identification of the presence of hazelnut, through the detection of a fragment of the gene encoding the allergenic protein Cor a 9; and
5. an amperometric biosensor, with improved analytical performance in terms of sensitivity, for the detection of a characteristic fragment of the *D-Loop* region of the horse's mitochondrial DNA, as an adulteration biomarker, based on the use of streptavidin-modified MBs, biotinylated synthetic RNA probes, DNA/RNA heterohybrids specific antibodies and commercial bioconjugates with multiple HRP molecules, as an amplification method.

All the platforms developed have demonstrated successful applicability for the direct determination of selected target markers in samples of different nature and complexity: milk or colostrum, protein or genetic extracts, raw mitochondrial lysates or human saliva. At this point, it is important to highlight that this Doctoral Thesis has proposed the first electroanalytical bioplatfroms for the determination of α -lactalbumin, Ara h 2, ovomucoid and bovine, ovine and caprine IgGs determination, and horsemeat identification. The reliable determination of peanuts (through the individual, dual or

total Ara h 1 and Ara h 2 detection) and eggs (through the ovomucoid detection) at trace levels in complex and/or processing food products, has been demonstrated. In addition, the use of MBs coupled to screen-printed electrodes in the manufacture of these biosensors has simplified and reduced the test times of the protocols commonly used in molecular biology for the isolation and determination of protein and genetic markers, without the need for complex instrumentation, leading to competitive strategies compatible with their use at the point of care. All of this has contributed to the publication of different research and scientific dissemination articles, and two Patents.

On the other hand, during the 6-month international stay performed at the University of California San Diego and supervised by Prof. Joseph Wang, delayed response electrochemical (bio)sensors have been developed which have demonstrated excellent properties for electrochemical biosensing after prolonged incubation in complex and/or denaturing biological media. These strategies are based on the use of integrated formats modified with commercial biocompatible polymers sensitive to pH and of controlled dissolution, which are deposited on the (bio)sensor surface protecting it from undesirable adsorption processes during its incubation in biological fluids and/or complexes, or with denaturing pH values. The applicability of the developed methodologies has been demonstrated by implementing a multisensing platform with delayed (6 h) and sequential (every 2 h) activation capacity for glucose monitoring. In addition, the excellent antifouling characteristics of these coatings have been exploited for glucose monitoring in biological and/or complex fluids, using screen-printed-based enzymatic biosensors, which preserve 100 % of the initial response after 2 h of incubation in samples of human saliva or undiluted whole blood, and in gastrointestinal fluids, with denaturing pH, using enzymatic biosensors manufactured with edible carbon pastes.

9. DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

La relevancia y calidad de las investigaciones realizadas durante esta Tesis Doctoral han permitido la publicación de 14 artículos de investigación (12 en revistas internacionales de medio-alto impacto y 2 en revistas nacionales de divulgación), la concesión de 1 Patente Europea y otra enviada, la presentación de 16 comunicaciones a 8 Congresos Internacionales (5 orales y 4 póster) a 6 Congresos Nacionales (5 orales y 2 póster) y la presentación de 4 comunicaciones orales en workshop o simposios nacionales. Fruto del conocimiento adquirido también se ha contribuido con un capítulo a un libro publicado por la Editorial Springer. Es importante destacar, además, que una de las publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral (la publicación nº 11) ha sido resaltada como contribución de vanguardia por la revista.

Publicaciones en revistas internacionales:

1. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, F. Conzuelo, R. M. Torrente-Rodríguez, M. Gamella, A. J. Reviejo y J. M. Pingarrón. **Electrochemical magnetoimmunosensing platform for determination of the milk allergen β -Lactoglobulin**. *Talanta* 131 (2015) 156–162.

Índice de impacto (2018): **4.916**

2. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, A. Pellicanò, R. M. Torrente-Rodríguez, A. J. Reviejo, M. S. Cosio y J. M. Pingarrón. **Sensitive and selective magnetoimmunosensing platform for determination of the food allergen Ara h 1**. *Anal. Chim. Acta* 880 (2015) 52–59.

Índice de impacto (2018): **5.256**

3. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, A. Pellicanò, S. Campuzano, R. M. Torrente-Rodríguez, A. J. Reviejo, M. S. Cosio y J. M. Pingarrón. **Electrochemical detection of peanuts at trace levels in foods using a magnetoimmunosensor for the allergenic protein Ara h 2**. *Sens. Actuators B Chem.* 236 (2016) 825–833.

Índice de impacto (2018): **6.393**

4. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente-Rodríguez, S. Campuzano, A. Pellicanò, A. J. Reviejo, M. S. Cosio y J. M. Pingarrón. **Simultaneous determination of the main peanut allergens in foods using disposable amperometric magnetic beads-based immunosensing platforms**. *Chemosensors* 4 (2016) 11.

Índice de impacto (2018): —

5. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, R. M. Torrente-Rodríguez, A. J. Reviejo y J. M. Pingarrón. **Electrochemical magnetic beads-based immunosensing platform for the determination of α -lactalbumin in milk.** *Food Chem.* 213 (2016) 595–601.

Índice de impacto (2018): **5.399**

6. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente-Rodríguez, G. González de Rivera, A. J. Reviejo, C. Cuadrado, R. Linacero, F. J. Gallego, S. Campuzano y J. M. Pingarrón. **Amperometric determination of hazelnut traces by means of Express PCR coupled to magnetic beads assembled on disposable DNA sensing scaffolds.** *Sens. Actuators B Chem.* 245 (2017) 895–902.

Índice de impacto (2018): **6.393**

7. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, M. L. Gutiérrez, R. M. Torrente-Rodríguez, Eloy Povedano, E. Vargas, A. J. Reviejo, R. Linacero, F. J. Gallego, S. Campuzano y J. M. Pingarrón. **Disposable amperometric PCR-free biosensor for direct detection of adulteration with horsemeat in raw lysates targeting mitochondrial DNA.** *Anal. Chem.* 89 (2017) 9474–9482.

Índice de impacto (2018): **6.35**

8. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, E. Vargas, R. M. Torrente-Rodríguez, M. Pedrero, A. J. Reviejo, S. Campuzano y J. M. Pingarrón. **Comparison of different strategies for the development of highly sensitive electrochemical nucleic acid biosensors using neither nanomaterials nor nucleic acid amplification.** *ACS Sens.* 3 (2018) 211–221.

Índice de impacto (2018): **6.944**

9. S. Benedé, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, M. Villalba, L. Mata, P. Galán-Malo, R. M. Torrente-Rodríguez, E. Vargas, A. J. Reviejo, S. Campuzano y J. M. Pingarrón. **Fast amperometric immunoplatfrom for ovomucoid traces determination in fresh and baked foods.** *Sens. Actuators B Chem.* 265 (2018) 421–428.

Índice de impacto (2018): **6.393**

10. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, J. R. Sempionatto, B. Esteban-Fernández de Ávila, A. Whitworth, S. Campuzano, J. M. Pingarrón y J. Wang. **Delayed sensor activation based on transient coatings: biofouling protection in complex biofluids.** *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 14050–14053.

Índice de impacto (2018): **14.695**

11. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, J. R. Sempionatto, S. Campuzano, J. M. Pingarrón, B. Esteban-Fernández de Ávila y J. Wang. **Direct electrochemical biosensing in gastrointestinal fluids.** *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 4597–4604. Resaltado como artículo de vanguardia.

Índice de impacto (2018): **3.286**

12. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, S. Benedé, L. Mata, P. Galán-Malo, M. Gamella, A. J. Reviejo, S. Campuzano, J. M. Pingarrón. **Disposable amperometric immunosensor for the detection of adulteration in milk through single or multiplexed determination of bovine, ovine or caprine immunoglobulins G.** *Anal. Chem.* 91 (2019) 11266–11274.

Índice de impacto (2018): **6.35**

Publicaciones en revistas nacionales de divulgación:

1. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, M. L. Gutiérrez, R. M. Torrente-Rodríguez, E. Povedano, E. Vargas, A. J. Reviejo, R. Linacero, F. J. Gallego, S. Campuzano y J. M. Pingarrón. **Biosensor electroquímico para la detección de adulteraciones con carne de caballo.** *Eurocarne* 262 (2017) 79–88.

2. S. Benedé, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, M. Villalba, L. Mata, P. Galán-Malo, R. M. Torrente-Rodríguez, E. Vargas, A. J. Reviejo, S. Campuzano y J. M. Pingarrón. **Biosensor para detector huevo.** *Revista Alimentaria* 500 (2019) 18–21.

Comunicaciones a congresos:

1. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, A. Pellicanò, R. M. Torrente-Rodríguez, A. J. Reviejo y J. M. Pingarrón. Comunicación oral: **“Novel amperometric magnetoimmunosensing platforms for fast, sensitive and selective determination of food allergens”**. Congreso Nacional: *XX Reunión de la Sociedad Española de Química analítica*. Santiago de Compostela (España), 1–3 Julio 2015.
2. S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente-Rodríguez, A. J. Reviejo y J. M. Pingarrón. Comunicación oral: **“Novel amperometric magntoimmunosensing platforms for food safety and consumer protection”**. Congreso Internacional: *Euroanalysis 2015*, Bordeaux (France), 6–9 Septiembre 2015.
3. R. M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, A. J. Reviejo y J. M. Pingarrón. Póster: **“Electrochemical detection coupled with functionalized magnetic micro-carriers: A promising alternative for food safety assessment and consumer protection”**. Congreso Internacional: *16th International Conference on Electroanalysis ESEAC*, Bath (United Kingdom), 12–16 Junio 2016.
4. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, A. Pellicanò, S. Campuzano, R. M. Torrente-Rodríguez, A. J. Reviejo, M. S. Cosio y J. M. Pingarrón. Póster: **“Simultaneous determination of the main peanut allergens in foods at a disposable amperometric magnetoimmunosensing platform”**. Congreso Internacional: *16th International Conference on Electroanalysis ESEAC*, Bath (United Kingdom), 12–16 Junio 2016.
5. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente-Rodríguez, S. Campuzano, A. J. Reviejo, F. J. Gallego, R. Linacero y J. M. Pingarrón. Comunicación oral: **“Micropartículas magnéticas acopladas a plataformas electroquímicas desechables para seguridad alimentaria: detección individual y múltiple de alérgenos y adulterantes”**. Congreso Nacional: *XXXVII Reunión del Grupo de Electroquímica de la RSEQ*, Alicante (España), 17–20 Julio 2016.
6. S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente-Rodríguez, A. J. Reviejo y J. M. Pingarrón. Comunicación oral: **“Bioplataformas electroanalíticas para seguridad alimentaria. Detección de alérgenos y adulteraciones alimentarias”**. Congreso Nacional: *Contaminantes emergentes en el siglo XXI*, Huesca (España), 28–29 Septiembre 2016.

7. S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente-Rodríguez, A. J. Reviejo y J. M. Pingarrón. Comunicación oral: **“Magnetic micro-carriers self-assembled disposable amperometric biosensors for food safety assesment and consumer protection”**. Congreso Internacional: *Batsheva de Rothschild Seminar on new Concepts in Biosensing*, Dead Sea (Israel), 12–16 Febrero 2017.
8. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, M. L. Gutiérrez, R. M. Torrente Rodríguez, E. Povedano, E. Vargas, A. J. Reviejo, R. Linacero, F. J. Gallego, S. Campuzano y J. M. Pingarrón. Póster: **“Electrochemical detection of food fraud involving horse meat adulteration using functionalized magnetic micro-carriers”**. Congreso Nacional: *XXXVI Reunión Biental de la Sociedad Española de Química*, Sitges (España), 25–29 Junio 2017.
9. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente-Rodríguez, E. Vargas, A. J. Reviejo, C. Cuadrado, R. Linacero, F. J. Gallego, S. Campuzano y J. M. Pingarrón. Póster: **“Determination of hazelnut traces in foods at disposable amperometric DNA sensing scaffolds coupled to express PCR”**. Congreso Nacional: *XXXVI Reunión Biental de la Sociedad Española de Química*, Sitges (España), 25–29 Junio 2017.
10. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente-Rodríguez, E. Povedano, E. Vargas, M. L. Gutiérrez, Á. J. Reviejo, C. Cuadrado, R. Linacero, F. J. Gallego, S. Campuzano y J. M. Pingarrón. Comunicación oral: **“Plataformas genosensoras electroanalíticas para seguridad alimentaria”**. Congreso Nacional: *XXXVIII Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química y XIX Encontro Ibérico de Electroquímica*, Vitoria (España), 5–7 Julio 2017.
11. S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, E. Vargas, R. M. Torrente-Rodríguez, M. Pedrero, A. J. Reviejo y J. M. Pingarrón. Comunicación oral: **“Simply handy and tailored sensitivity electrochemical DNA/RNA biosensing methodologies”**. Congreso Internacional: *23rd Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry*, Vilnius (Lithuania), 8–11 Mayo 2018.

12. S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, M. Barros, E. Vargas, R. M. Torrente-Rodríguez, S. Benedé, L. Martín-Pedraza, R. Linacero, F. J. Gallego, A. J. Reviejo, F. Barroso, J. M. F. Rocha, M. Villalba y J. M. Pingarrón. Comunicación oral: **“Versatile and reliable electrochemical biosensing for food analysis with tailored sensitivity at different molecular levels”**. Congreso Internacional: *Bioelectrochemistry and Bioelectronics of Macromolecules Meeting*, Brno (Czech Republic), 12–15 Junio 2018.
13. S. Benedé, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, M. Villalba, L. Mata, P. Galán-Malo, R. M. Torrente-Rodríguez, E. Vargas, A. J. Reviejo, S. Campuzano y J. M. Pingarrón. Póster: **“Fast amperometris immunoplatfrom for ovomucoid traces determination in fresh and baked foods”**. Congreso Internacional: *4th International ImpARAS Conference*, Portici (Italia), 18–21 Junio 2018.
14. S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, M. Barros, E. Vargas, R. M. Torrente-Rodríguez, S. Benedé, L. Martín-Pedraza, R. Linacero, F. J. Gallego, A. J. Reviejo, F. Barroso, J. M. F. Rocha, M. Villalba y J. M. Pingarrón. Comunicación oral: **“PCR-free electrochemical biosensing of animal or plant-food derived nucleic acids in raw mitochondrial and genomic DNA extracts”**. Congreso Internacional: *The 69th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry*, Bologna (Italia), 2–7 Septiembre 2018.
15. S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, M. Gamella, A. J. Reviejo y J. M. Pingarrón. Comunicación oral: **“Disposable electrochemical biosensing platforms: marketable and reliable tools for food safety”**. Congreso Nacional: *XXXVII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química*, San Sebastián (España), 26–30 Mayo 2019.
16. S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, M. Gamella, A. J. Reviejo y J. M. Pingarrón. Póster: **“Electrochemical bioplatfroms: reliable and marketable tools for food adulteration and safety”**. Congreso Internacional: *International Conference on Chemical Sensors*, Mátrafüred (Hungría), 16–21 Junio 2019.

17. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel. Comunicación oral: “**Magnetobiosensores amperométricos para detección de alérgenos y fraudes alimentarios**”. Workshop: *Jornadas científico-formativa sobre estrategias nanotecnológicas para la construcción de (bio)sensores en instrumentación miniaturizada para aplicaciones clínicas y agroalimentarias*, Madrid (España), 20 Enero 2016.
18. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel. Comunicación oral: “**Plataformas genosensoras electroanalíticas para seguridad alimentaria**”. Workshop: *Electrobionet*, Madrid (España), 18 Noviembre 2016.
19. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, A. J. Reviejo, R. Linacero, F. J. Gallego, S. Campuzano y J. M. Pingarrón. Comunicación oral: “**Nuevas plataformas de biosensado electroanalítico fiable para seguridad alimentaria**”. Simposio: *II Simposio Anual en Química Avanzada de la Universidad Complutense de Madrid*, Madrid (España), 18–21 Septiembre 2017.
20. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, A. Valverde, A. J. Reviejo, S. Campuzano y J. M. Pingarrón. Comunicación oral: “**Micromagnetic biocaptors and disposable electrodes: an easy food safety solution**”. Workshop: *Brain Wars the future is in your hands, Madrid-UCM Student chapter*, Madrid (España), 19 Octubre 2018.

Capítulos de Libro:

1. S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente Rodríguez, A. J. Reviejo y J. M. Pingarrón. Capítulo: **Electrochemical biosensors for food security: allergens and adulterants detection**. Título del libro: *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications*, Advanced Sciences and Technologies for Security Applications, Capítulo 14 (2016) pp. 287-307. Editores: Dimitrios Nikolelis, Georgia-Paraskevi Nikoleli. Editorial: Springer. Print ISBN: 978-3- 319-28924-3. Nueva York, Estados Unidos.

Patentes:

1. J. M. Pingarrón, S. Campuzano, F. J. Gallego, R. Linacero, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel.

Título: “Método y kit para detectar y/o cuantificar la presencia de ADN de caballo en muestras aisladas”.

N. de solicitud: P201700642 (concedida 28 Mayo 2018)

Entidad titular: UCM

2. V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, S. Campuzano, S. Benedé, J. M. Pingarrón, A. J. Reviejo, M. Gamella, L. Mata, P. Galán-Malo.

Título: “Método y plataforma electroquímica inmunosensora para la detección y/o cuantificación de adulteraciones en leche y productos lácteos”.

N. de solicitud: P201900082 (enviada OEPM 17 Mayo 2019)

Entidad titular: UCM (80%)-ZEULAB S.L. (20%)

10. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A

A

Ab_{ADN/ARN}: anticuerpo selectivo a heterohíbridos de ADN-ARN / DNA-RNA
heterhybrid selective antibody.

ADN / DNA: ácido desoxirribonucleico / deoxyribonucleic acid.

ADNmt: ADN mitocondrial / mitochondrial DNA.

ADNDp-Janus: sonda de detección/precursora / detection/precurso probe.

AEDT: sal disódica del ácido etilendiaminotetracético / ethylenediaminetetraacetic acid
disodium salt.

α -LA: α -lactoalbúmina / α -lactalbumin.

anti- α -LA: anticuerpo de captura específico para α -LA / α -LA-specific capture
antibody.

anti- α -LA-HRP: anticuerpo de detección específico para α -LA conjugado con HRP /
 α -LA-specific detector antibody conjugated with HRP.

anti-Ara h 1: anticuerpo de captura específico para Ara h 1 / Ara h 1-specific capture
antibody.

anti-Ara h 2(C): anticuerpo de captura específico para Ara h 2 / Ara h 2-specific
capture antibody.

anti-Ara h 2(D): anticuerpo de detección específico para Ara h 2 / Ara h 2-specific
detector antibody.

anti- β -LG: anticuerpo de captura específico para β -LG / β -LG-specific capture
antibody.

anti- β -LG- HRP: anticuerpo de detección específico para β -LG conjugado con HRP /
 β -LG-specific detector antibody conjugated with HRP.

anti-Bov: anticuerpo de captura específico para IgGs bovinas / bovine IgGs-specific
capture antibody.

anti-Bov-HRP: anticuerpo de detección específico para IgGs bovinas conjugado con
HRP / bovine IgGs-specific detector antibody conjugated with HRP.

anti-Cap: anticuerpo de captura específico para IgGs caprinas / caprine IgGs-specific
capture antibody.

anti-Cap-HRP: anticuerpo de detección específico para IgGs caprinas conjugado con
HRP / caprine IgGs-specific detector antibody conjugated with HRP.

anti-FITC-HRP: fragmentos Fab de anticuerpo conjugado con HRP específico de FITC / Fab fragments of FITC-specific antibody conjugated with HRP.

anti-IgG-HRP: anticuerpo secundario conjugado con HRP específico de inmunoglobulinas de ratón / mouse immunoglobulin-specific secondary antibody conjugated with HRP.

anti-OM: anticuerpo de captura específico para OM / OM-specific capture antibody.

anti-OM-HRP: anticuerpo de detección específico para OM conjugado con HRP / OM-specific detector antibody conjugated with HRP.

anti-Ovi: anticuerpo de captura específico para IgGs ovinas / ovine IgGs-specific capture antibody.

anti-Ovi-HRP: anticuerpo de detección específico para IgGs ovinas conjugado con HRP / ovine IgGs-specific detector antibody conjugated with HRP.

AP: fosfatasa alcalina / alkaline phosphatase.

ARN / RNA: ácido ribonucleico / ribonucleic acid.

ARNm: ARN mensajero / messenger RNA.

ASV: voltamperometría de redisolución anódica / anodic stripping voltammetry.

ATP: adenosin trifosfato / adenosine triphosphate.

AuNPs: nanopartículas de oro / gold nanoparticles.

B

B

B: blanco / blank.

b: biotina / biotin.

b-anti-Ara h 1: anticuerpo de detección específico para Ara h 1 biotinilado / biotinylated Ara h 1-specific detector antibody.

b-ADNCp: sonda de captura de ADN biotinilada / biotinylated DNA capture probe.

b-ADNDp: sonda de detección de ADN biotinilada / biotinylated DNA detection probe.

b-ARNCp: sonda de captura de ARN biotinilada / biotinylated RNA capture probe.

b-Cp: sonda de captura biotinilada / biotinylated capture probe.

b-Dp: sonda de detección biotinilada / biotinylated detection probe.

β -LG: β -lactoglobulina / β -lactoglobulin.

BQ: benzoquinona / benzoquinone.

Bov-IgG: inmunoglobulinas G bovinas / bovine immunoglobulins G.

BSA: albúmina de suero bovino / bovine serum albumin.

C

C

C: capas / layers.

Cap-IgG: inmunoglobulinas G caprinas / caprine immunoglobulins G.

C.D: cebador directo / forward primer.

CE: Comisión Europea / European Commission.

C.I: cebador inverso / reverse primer.

CNF: nanofibras de carbono / carbon nanofibers.

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio / hexadecyltrimethylammonium bromide.

CV: voltamperometría cíclica / cyclic voltammetry.

D

D

DPV: voltamperometría diferencial de impulsos / differential pulse voltammetry.

E

E

EDC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida / N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide.

EIS: espectroscopia de impedancia electroquímica / electrochemical impedance spectroscopy.

ELIAC: cromatografía de inmunoafinidad enzimática / enzyme-linked immunoaffinity chromatography.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas / enzyme-linked immunosorbent assay.

Estrep-HRP / Strep-HRP: estreptavidina conjugada con HRP / HRP-conjugated streptavidin.

Estrep-MBs / Strep-MBs: MBs modificadas con estreptavidina / streptavidin-modified MBs.

ET: etanolamina / ethanolamine.

F

F

Fab: región de Ig de unión al antígeno / Ig region of antigen binding.

F(ab')₂-HRP: fragmento Fab de anticuerpo secundario conjugado con HRP / Fab fragment of secondary antibody conjugated with HRP.

Fc: fracción de Ig constante / constant Ig fraction.

FET: transistores de efecto de campo / field-effect transistors.

FITC: isotiocianato de fluoresceína / fluorescein isothiocyanate.

FITC-ADNDp: sonda de detección de ADN modificada con FITC / FITC-modified DNA detection probe.

FITC-AP: secuencia de ADN lineal modificada con FITC / FITC-modified linear DNA sequence.

G

G

G: disolución simulada de fluido gástrico / simulated gastric fluid solution.

GCE: electrodo de carbono vítreo / glassy carbon electrode.

GOx: glucosa oxidasa / glucose oxidase.

H

H

HCR: reacción de hibridación en cadena / hybridization chain reaction.

HDA: amplificación dependiente de helicasa / helicase dependent amplification.

HOOC-MBs: MBs modificadas con grupos carboxílicos / carboxylic-modified MBs.

HQ: hidroquinona / hydroquinone.

HRP: peroxidasa de rábano / horseradish peroxidase.

HTST: pasteurización flash (72 °C/15 s) / high temperature/short time pasteurization (72 °C/15 s).

H33258: 2-(4-hidroxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5-bi(1H-benzimidazol), H33258 / 2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5-bi(1H-benzimidazole), H33258.

I

I

I: disolución simulada de fluido intestinal / simulated intestinal fluid solution.

Ig: inmunoglobulina / immunoglobulin.

IgG: inmunoglobulina G / immunoglobulin G.

IgE: inmunoglobulina E / immunoglobulin E.

I.L: intervalo lineal / linear range.

ISF: fluido intersticial / interstitial fluid.

L

L

LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucles / loop-mediated isothermal amplification.

LC / LOQ: límite de cuantificación / limit of quantification.

LD / LOD: límite de detección / limit of detection.

LIF: fluorescencia inducida por láser / laser-induced fluorescence.

LPO: lactoperoxidasa / lactoperoxidase.

LSV: voltamperometría de barrido lineal / linear sweep voltammetry.

LTPs: proteínas de transferencia de lípidos / lipid transfer proteins.

M

M

m: pendiente / slope.

MBs: partículas magnéticas / magnetic beads.

MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico / 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid.

MNPs: nanopartículas magnéticas / magnetic nanobeads.

MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple / multi-walled carbon nanotubes.

N

N

NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina/ nicotinamide adenine dinucleotide.

NaPSS: poli(4-estirenosulfonato de sodio) / poly(sodium 4-styrenesulfonate).

ND: no detectable / non-detectable.

O

O

OM: ovomucoide /ovomucoid.

OVA: ovalbúmina / ovalbumin.

Ovi-IgG: inmunoglobulinas G ovinas / ovine immunoglobulins G.

P

P

PB: Azul de Prusia / Prussian Blue.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa / polymerase chain reaction.

RFLP: polimorfismo de longitud de fragmento de restricción / restriction fragment length polymorphism.

PBS: disolución reguladora de fosfato salina / saline phosphate buffer.

PBST: disolución reguladora de fosfato salina suplementada con Tween®20 0.05% (v/v) / saline phosphate buffer supplemented with Tween®20 0.05% (v/v).

PEDOT: polietileno (3,4-etilendioxitiofeno) / polyethylene (3,4-ethylenedioxythiophene).

PEG: poli(etilenglicol) / poly(ethylene glycol).

PEO: poli(óxido de etileno) / poly(ethylene oxide).

PET: tereftalato de polietileno / polyethylene terephthalate.

p-l-Arg: poli(l-Arginina) / poly(l-Arginine).

POC: punto de atención / point-of-care.

ProtA: proteína A / protein A.

ProtA-HRP: proteína A conjugada con HRP / HRP-conjugated protein A.

ProtA-poli-HRP40: proteína A conjugada con un homopolímero que contiene 40 moléculas de HRP / protein A conjugated with a homopolymer containing 40 HRP molecules.

ProtG-MBs: MBs modificadas con proteína G / protein G-modified MBs.

Q

Q

qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real / quantitative real-time PCR.

R

R

RCA: amplificación de círculo rodante / rolling-circle amplification.

RIA: radio inmunoensayos / radio immunoassays.

RID: inmunodifusión radial / radio immunodiffusion.

RSD: desviación estándar relativa / relative standard deviation.

RT-PCR: PCR en tiempo real / real-time PCR.

rpm: revoluciones por minutos / revolutions per minute.

S

S

S: señal / signal.

SAMs: monocapas autoensambladas / self-assembled monolayers.

s_b: desviación estándar del blanco / blank standard deviation.

s: desviación estándar / standard deviation.

S/B: relación señal/blanco / signal-to-blank ratio.

SDA: amplificación iniciada por polimerasa / polymerase-triggered amplification.

SDS: dodecil sulfato sódico / sodium dodecyl sulphate.

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida con SDS / SDS-polyacrylamide gel.

SPAuE: electrodo serigrafiado de oro / screen-printed gold electrode.

SPCE: electrodos serigrafiados de carbono / screen printed carbon electrodes.

SPC4E: SPE con 4 electrodos de trabajo / SPE with 4 working electrodes.

SPdCE: electrodos serigrafiados duales de carbono / dual screen-printed carbon electrodes.

SPE: electrodos serigrafiados / screen-printed electrodes.

SPPtE: electrodos serigrafiados de platino / screen-printed platinum electrodes.

SPR: resonancia de plasmones superficiales / surface plasmon resonance.

Sulfo-NHS: N-hidroxisulfosuccinimida / N-hydroxysulfosuccinimide.

SWV: voltamperometría de onda cuadrada / square wave voltammetry.

W

W

WE: electrodo de trabajo / working electrode.

Z

Z

ZFP: proteína dedos de zinc / zinc finger protein.

Número

Número

3-IP: 3-indoxil fosfato / 3-indoxyl phosphate.